C.3.A.121

REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Inst. Med. trop. São Paulo, vol. 2, n.° 3, p. 127 - 190 ★ Maio/Junho, 1960

O caminho certo na terapia da amebíase...

DIANTIL

(Clorbetamida)

Amebicida não-metálico...

de ação intensa...

com doses reduzidas

"Diantil é um amebicida sintético não-metálico que se caracteriza por grande atividade e baixa toxicidade". *E. W. Dennis e D. A. Berberian, Antibiotics & Chemotherapy, 6:554, maio, 1954.*

"O que mais sobreleva notar, no tratamento com Diantil, é sua perfeita tolerância." *D. T. Lucena e R. J. Marques, Revista Brasileira de Medicina, vol. XIII, n.º 11, nov. 1955.*

D I 1 - 60

Comprimidos contendo 0,5 g de N-(2,4-diclorobenzil)-N-(2-hidroxietil) dicloroacetamida. Caixas de 24.

DIANTIL Marca registrada é um produto **WINTHROP**

WINTHROP

Distribuidores: The Sydney Ross Co., Av. Rio Branco, 251, 11.º and., Rio de Janeiro

Galeria de Tropicalistas Brasileiros

JOSÉ FRANCISCO DA SILVA LIMA

Nascido em Portugal, na aldeia de Vilarinho, a 15 de janeiro de 1826, veio para o Brasil aos catorze anos, fixando-se na Bahia. Desprovido de maiores recursos, empregou-se no comércio, conseguindo nas horas vagas estudar e completar o curso de humanidades. Matriculou-se então na Faculdade de Medicina da Bahia, vindo, após brilhante tirocínio acadêmico, a receber o grau de doutor em 1851, defendendo tese intituladada "A fôrça medicatriz da Natureza".

Numa época em que a clínica ainda se encontrava tateando às cegas no emaranhado dos sintomas, pôde Silva Lima fazer esplêndidas observações e individualizar entidades mórbidas, graças à sua extraordinária capacidade de investigador.

Ligado intimamente a Wucherer e Paterson, dois outros médicos igualmente dotados dos mesmos pendores e qualidades excepcionais, implantou na Cidade do Salvador o primeiro marco do estudo das doenças tropicais no Brasil, a famosa Escola Tropicalista Baiana.

Estabeleceu em sua própria residência, há um século atrás, o primeiro biotério instalado em nossas plagas, criando animais de laboratório (cobaios, coelhos, etc.), nos quais costumava fazer estudos de parceria com Wucherer, possuidor de um microscópio, através de cujas lentes ficavam os dois até desoras, a lobrigar elementos invisíveis a ôlho nu. Tôdas as semanas, reuniam-se em mesa redonda êsses três notáveis pesquisadores, a trocarem idéias sôbre os casos verificados no âmbito de suas respectivas clientelas.

Destarte, veio Silva Lima a identificar e estudar pormenorizadamente o *beribéri* ("doença indiana") em suas diversas formas clínicas, apresentando classificação precisa, ainda hoje de pé, a separar com absoluta clareza as duas modalidades essenciais da moléstia: a paralítica e a edematosa, às vêzes associadas entre si. O *ainhum*, essa estranha doença peculiar à raça negra, no Brasil, caracterizada por um estrangulamento progressivo dos dedos mínimos dos pés foi também por êle com tal minúcia estudado, que hoje é crismado de *doença de Silva Lima*.

Outrossim, teve ensejo Silva Lima de fazer estudos pioneiros sôbre as formas clínicas da filariose bancroftiana, publicando numerosos trabalhos a partir de 1877.

Fundada a Gazeta Médica da Bahia, no ano de 1866, pela tríade gloriosa retro-enumerada, nela colaborou Silva Lima com entusiasmo, publicando observações e estudos do mais subido valor. Foi nas páginas dêsse mensário que inseriu o seu "Glossário Médico", hoje quase totalmente ignorado.

Viajou diversas vêzes à Europa, onde colhia os melhores frutos da época no domínio das Ciências Médicas, transportando-os a seguir para o nosso meio.

Naturalizado brasileiro, e depois de longa e fecunda existência, sempre dedicada ao bem da humanidade, finou-se na Cidade do Salvador a 10 de fevereiro de 1910.

Como muito bem salientou Oscar Monteiro de Barros, ao comentar o seu magistral "Ensaios sôbre o Beribéri no Brasil", quatro excelsas qualidades exornavam o vulto inconfundível de Silva Lima: escrúpulo, modéstia, espírito de investigação e grande tino clínico.

E. C. Falcão

Gallery of Brazilian Tropicalists

JOSÉ FRANCISCO DA SILVA LIMA

José Francisco da Silva Lima was born in Vilarinho Village, Portugal, on January 15, 1826. When fourteen years old he came to Brazil, settling down in Bahia. Being poor he procured himself a job in commerce and in his spare time he managed to study and graduate in Humanities. He then enrolled in the Bahia Faculty of Medicine, where after a brilliant course, he received his M.D. degree in 1851.

At a time when medical practice was still entangled in a web of symptoms, Silva Lima has been able to make outstanding observations and individualize morbid entities, thanks to his extraordinary capacity.

Closely attached as he was to Wucherer and Patterson, two physicians equally endowed with the same tendencies and exceptional qualities, he planted in the City of Salvador the first stepping stone for the study of tropical diseases in Brazil, the Bahia School of Tropicalists.

One century ago Silva Lima established at his own home the first bioterium in our country. He reared laboratory animals (Guinea pigs, rabbits, etc.) which he used, along with Wucherer, for research; Wucherer owned a microscope through whose lenses he and Silva Lima peered until the small hours.

These three noteworthy researchers got weekly together in order to exchange ideas upon the cases occurring in their respective practices.

Silva Lima identified and minutely studied *beriberi* in its various clinical forms, coming forward with a precise classification which stands to date; distinction between the two main modalities of the disease was made with absolute precision, the paralytic and the edematous ones, which sometimes are associated. *Ainhum*, this strange disease characterized by the progressive strangulation of the little toes, has also been studied by him with a minuteness such as to cause it to be chrismed *Silva Lima's disease*.

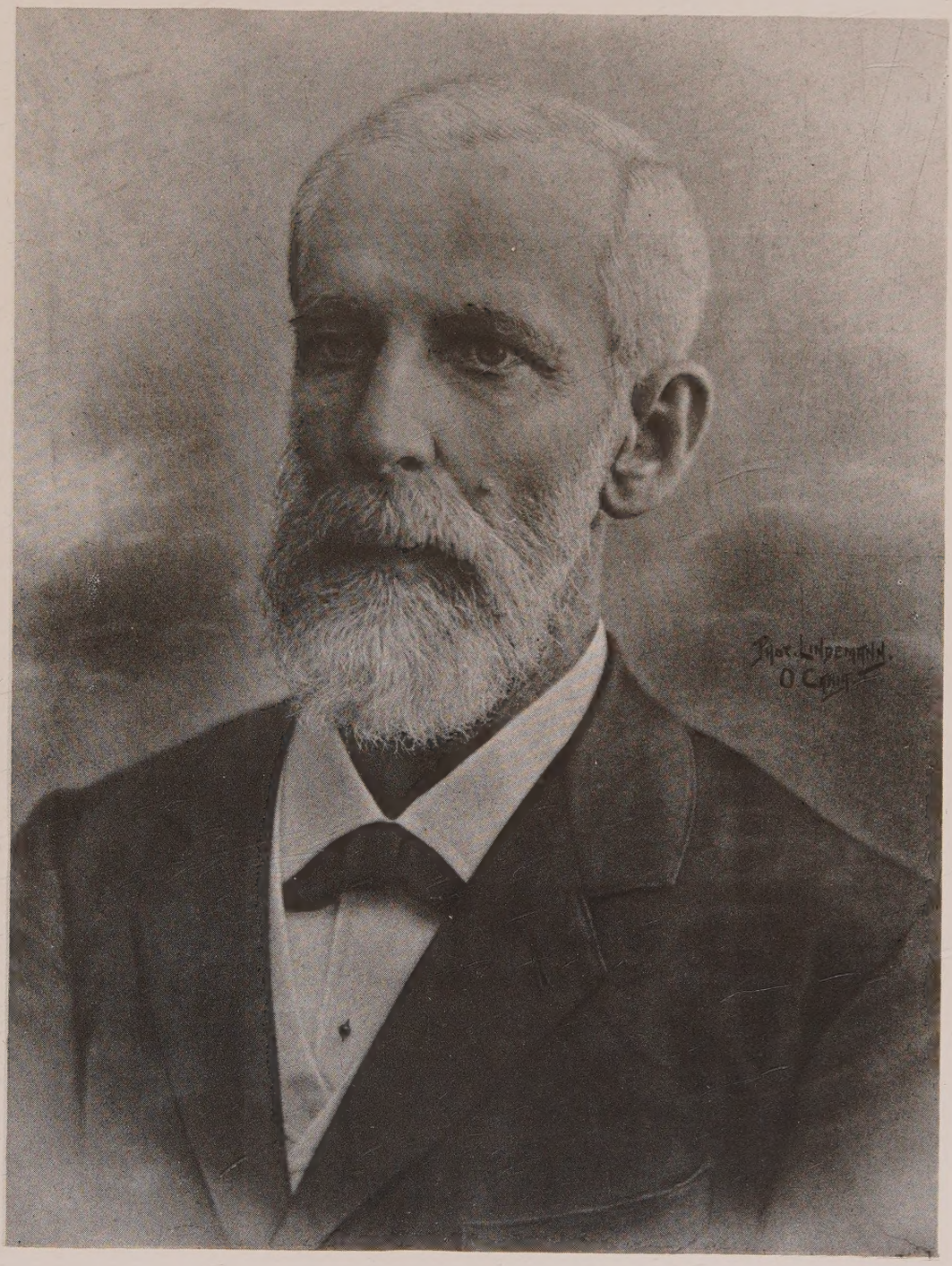
He has been a pioneer in the study of Bancroftian filariasis, publishing many papers on the subject since 1877.

In 1866 the three above-mentioned scientists founded the "Gazeta Médica da Bahia", to which Silva Lima enthusiastically contributed with observations and studies of the utmost value. It was in the pages of this monthly that his "Glossário Médico" (Medical Vocabulary) was published, and which is at present almost completely forgotten.

He went a number of times to Europe where the reaped the epoch's best fruit as concerned the Medical Sciences, bringing it afterwards back home with him to Brazil.

He became a Brazilian subject and, after a long and fruitful life, he died in the City of Salvador, on February 10, 1910.

E. C. Falcão


Prof. LINDEMANN.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(3):131-139, maio-junho 1960

ESTUDOS SÔBRE AS ESTAFILOCOCCIAS

II — Incidência de portadores entre crianças hospitalizadas; antibiograma e fagocitagem das amostras obtidas de colheitas semanais

Eduardo Marcondes MACHADO [1], C. SOLÉ-VERNIN [2], Cecilia Mattos ULSON [3], Fernando Proença GOUVEIA [4], José Augusto Nigro CONCEIÇÃO [5], Hebe da Silva COELHO [1], Francisco de Paula NEVES FILHO [1] e J. Aleixo da SILVA [1]

RESUMO

Os autores observaram a incidência de portadores em 12 crianças internadas pela primeira vez na Clínica Pediátrica de um Hospital Geral, colhendo semanalmente durante 9 semanas, exsudato de nariz e de garganta para isolamento de estafilococos patogênicos, e fagotipagem e antibiograma das amostras obtidas. Verificaram que sòmente uma criança apresentou culturas sistemàticamente negativas durante todo o período de observação. Quatro crianças já eram portadoras no momento da admissão e, bastante curioso, seus fagótipos eram 80 e 81, os mais comumente implicados em epidemias intra-hospitalares. Quatro crianças apresentaram colonização constante por um mesmo fagótipo, embora tal fato não tivesse ocorrido desde a primeira colheita de exsudatos. Estiveram presentes 12 padrões fagotípicos, com predominância de 3 dêles: 75 (44,6%), 80 (16,1%) e 52/80 (16,1%). Os antibiogramas médios dos fagótipos 80 e 52/80 são semelhantes e mostram muito maior sensibilidade aos 11 antibióticos observados do que o antibiograma médio do fagótipo 75; êste é caracterizado por grande resistência à penicilina, estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina.

INTRODUÇÃO

Atualmente as estafilococcias e as septicemias por bacilos Gram-negativos são consideradas os dois principais problemas em infecções bacterianas [10]. Até o momento foi impossível controlar as estafilococcias por meio de qualquer um dos sucessivos antibióticos que se descobriram, porque o estafilococo, com rara facilidade, vai-se tornando resistente aos novos agentes terapêuticos. Tudo parece indicar que a solução do problema não será encontrada na constante procura de novos antibióticos, mas no melhor conhecimento dos aspectos bacteriológicos, epidemiológicos e patogênicos do mesmo [10].

Em trabalho anterior [12] verificamos: a) prevalências estatìsticamente semelhantes de *Staphylococcus aureus* em crianças internadas e em crianças sem contato com o hospital; b) inexistência de um único fagótipo predominante nos portadores intra-hospitalares; c) antibiograma médio das amostras de *S. aureus* intra-hospitalares altamente di-

Fac. Medicina da Univ. São Paulo — Clínica Pediátrica (Prof. P. Alcântara) e Inst. Med. Tropical, Dep. Microbiologia e Imunologia (Prof. C. S. Lacaz).

(1) Médico Auxiliar (Pediatria).
(2) Assistente (Microbiologia).
(3) Biologista (Microbiologia).
(4) Médico do Pronto Socorro (Pediatria).
(5) Médico Voluntário (Pediatria).

ferente do antibiograma médio das amostras extra-hospitalares. Os dados mostraram que as amostras de *S. aureus* presentes na Enfermaria apresentavam *in vitro* alta resistência a vários dos antibióticos empregados, ainda que não fôsse possível surpreender predominância de um único tipo e não existisse situação clínica indicadora de epidemia estafilocócica.

No presente trabalho estudamos, mais pormenorizadamente, as crianças admitidas na Enfermaria por diversos motivos que não estafilococcias, acompanhando-as por meio de exames bacteriológicos semanais, com o fim de verificar as condições de sua colonização estafilocócica. Tal como no trabalho anterior, as amostras isoladas foram caracterizadas pela fagotipagem e pelo antibiograma.

Há três maneira de caracterizar um estafilococo *: 1) pela fagotipagem; 2) pelo antibiograma; 3) pela sorologia. Utilizamos os dois primeiros processos. Sob certas condições, todos os três são equiparáveis na prática [13].

Padrão bacteriofágico é a série dos fagos que lisam significantemente uma determinada amostra de estafilococo. Os padrões se dividem em quatro grandes grupos em correspondência aos grupos sorológicos de Cowan. Nem todos os estafilococos são fagotipáveis; a percentagem varia de acôrdo com o número de fagos disponíveis. Em geral 60 a 80% dos estafilococos são fagotipáveis [3, 21], mas alguns autores dão cifras de 35% [9], e outros, de pràticamente 100% [1]. As amostras obtidas em hospitais pertencem em geral ao grupo sorológico III de Cowan [2].

MATERIAL E MÉTODOS

Observaram-se 12 crianças da Enfermaria de Clínica Pediátrica, cuja capacidade habitual é de 40 a 50 internados. De tôdas as crianças colheram-se semanalmente exsudato de nariz (fossas nasais anteriores) e de garganta (ao nível das amígdalas). A primeira colheita foi realizada sempre antes das 48 horas de internação. Tôdas as crianças estudadas estavam entrando pela primeira vez em contato com o nosso ambiente hospitalar. O período de colheita estendeu-se de 14-10-1959 a 3-2-1960. Em 8 casos realizaram-se 10 colheitas; em 1 caso, 8 colheitas; em 1 caso, 7 colheitas; em 2 casos, 6 colheitas.

As técnicas empregadas no isolamento do estafilococo, prova de coagulase, antibiograma e fagotipagem já foram referidas em trabalho anterior [12]. No antibiograma foram empregados os seguintes antibióticos: penicilina, estreptomicina, cloranfenicol, clortetraciclina — neste trabalho referida como aureomicina ** — oxitetraciclina — neste trabalho referida como terramicina *** — tetraciclina, espiramicina, eritromicina, novobiocina, kanamicina e neomicina.

As provas de sensibilidade aos antibióticos foram realizadas por meio da técnica dos discos, técnica esta criticada por alguns autores, mas largamente utilizada em todo o mundo por ser muito prática; autores a ela favoráveis propõem que o contrôle da padronização dos discos seja feito por um organismo internacional [4].

RESULTADOS

No quadro I vemos o resumo dos achados com relação à fagotipagem e ao tipo de colonização.

Dentre as 12 crianças, 4 (33%) já estavam infectadas pelo estafilococo no momento de serem admitidas na enfermaria; e, bastante curioso, três delas com os fagótipos 80, 80 e 81, respectivamente (a quarta amostra mostrou-se não-tipável). Das 8 restantes, uma não se infectou durante as 9 semanas em que foi observada (caso 7). Em 3 casos (2, 3 e 6) obtivemos colonização por um só tipo, e assim mesmo, a partir da 2ª, 3ª e 4ª semanas, respectivamente. Como exemplos, apresentamos, no quadro II, o que ocorreu com o caso 6 (colonização pelo mesmo fagótipo a partir da 5ª semana); e no quadro III, o que ocorreu com o caso 7 (colonização sucessiva por diversos fagótipos). Só 1 caso (6) apresentou-se como

* Neste trabalho, o têrmo estafilococo, mesmo desacompanhado de qualificação, se refere ao *Staphylococcus aureus*, coagulase-positivo.

** Marca comercial dos Laboratórios Lederle.

*** Marca comercial dos Laboratórios Pfizer.

QUADRO I

Relação geral das culturas positivas para *Staphylococcus aureus*, fagotipagem e tipo de colonização.

Caso	*Nº de colheitas efetuadas*	*Culturas positivas*			*Total de culturas positivas*	*Fagotipagem*			*Tipo de colonização*	
		Nariz	*Garganta*	*Nariz + garganta*		*Nº realizado*	*Não tipável*	*Tipos obtidos*	*Quanto ao fago*	*Quanto ao tempo*
1	10	6	1	2	11	8	—	71 — 1 vez 75 — 3 vêzes 80 — 4 vêzes	V	I
2	10	7	—	—	7	7	—	75 — 6 vêzes 80 — 1 vez	C2	I
3	7	2	1	2	7	6	1	52/80 — 5 vêzes	C3	I
4	10	5	1	4	14	13	10	75 — 2 vêzes 80 — 1 vez	V	P
5	6	2	1	—	3	3	1	53/75/77 — 2 vêzes	V	I
6	10	9	—	—	9	9	—	75 — 6 vêzes 52/80 — 2 vêzes 81 — 1 vez	C4	I
7	10	—	—	—	—	...	...	...	...	...
8	10	4	—	3	10	6	—	75 — 1 vez 52A/79 — 1 vez 52/80 — 1 vez 53/75 — 1 vez 80 — 2 vêzes	V	I
9	10	4	1	—	5	5	—	80 — 1 vez 52/ 80 — 1 vez 75 — 2 vêzes 29/53/80 — 1 vez	V	I
10	10	6	1	—	7	7	—	75 — 4 vêzes 77 — 2 vêzes 53/75/77 — 1 vez 53/75 — 1 vez 42E/53/75/77 — 1 vez 6/7/47/53/54/73/75/77 — 1 vez	V	I
11	8	1	1	—	2	1	—	75 — 1 vez	V	I
12	6	1	—	1	3	3	3	...	C5?	I

V = variável C = constante P = permanente I = intermitente

C2, C3, etc..., constante a partir da 2ª, 3ª, etc... semanas.

QUADRO II

Fagotipagem e antibiograma das amostras de *Staphylococcus aureus* obtidas de colheitas semanais de exsudato da garganta e do nariz e expressas em escala de 1 a 4 segundo o grau crescente de sensibilidade (caso 6).

Semana	*Resultado da cultura segundo a fonte*	*Fagotipagem*		*Antibiograma*										
		R.T.D.	*R.T.D.* × 1.000	*Penicilina*	*Estreptomicina*	*Cloranfenicol*	*Aureomicina*	*Terramicina*	*Tetraciclina*	*Espiramicina*	*Eritromicina*	*Novobiocina*	*Kanamicina*	*Neomicina*
1ª	N pos.	81	...	2	—	2	1	2	1	3	4	3	3	4
	G neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
2ª	N pos.	52/80	...	1	—	1	—	1	1	2	4	1	3	4
	G neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
3ª	N pos.	...	52/80	—	—	—	—	—	—	3	4	—	4	4
	G neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
4ª	N neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	G neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
5ª	N pos.	75	...	—	—	—	—	—	—	3	3	3	4	4
	G neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
6ª	N pos.	75	...	—	—	—	—	—	—	3	4	3	3	4
	G neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
7ª	N pos.	75	...	—	—	—	—	—	—	3	4	3	4	4
	G neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
8ª	N pos.	75	...	—	—	—	—	—	—	2	4	4	4	4
	G neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
9ª	N pos.	75	...	—	—	—	1	—	—	2	4	4	4	4
	G neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
10ª	N pos.	75	...	—	—	—	—	—	1	3	4	4	4	4
	G neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

N = nariz G = garganta R.T.D. = "Routine Test Dilution"

QUADRO III

Fagotipagem e antibiograma das amostras de *Staphylococcus aureus* obtidas de colheitas semanais de exsudato da garganta e do nariz e expressas em escala de 1 a 4 segundo o grau crescente de sensibilidade (caso 7).

Semana	*Resultado da cultura segundo a fonte*	*Fagotipagem R.T.D.*	*Antibiograma*										
			Penicilina	*Estreptomicina*	*Cloranfenicol*	*Aureomicina*	*Terramicina*	*Tetraciclina*	*Espiramicina*	*Eritromicina*	*Novobiocina*	*Kanamicina*	*Neomicina*
1ª	N neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	G neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
2ª	N pos.	Não testado	1	1	2	1	3	3	3	4	4	4	4
	G neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
3ª	N pos.	52A/79	—	—	2	2	2	2	2	4	2	4	4
	G neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
4ª	N neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	G neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
5ª	N neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	G neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
6ª	N pos.	52/80	—	—	3	—	—	—	2	3	4	4	3
	G neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
7ª	N pos.	80	1	—	3	1	—	—	3	4	4	4	3
	G pos.	Não testado	—	—	3	1	—	1	3	3	4	4	4
8ª	N pos.	Não testado	—	—	4	2	—	—	2	4	4	4	4
	G pos.	Não testado	2	—	3	—	—	—	4	4	4	4	4
9ª	N pos.	53/75	—	—	1	1	—	—	2	3	4	4	4
	G pos.	80	—	—	1	1	—	—	2	3	4	4	3
10ª	N pos.	75	—	—	—	1	—	—	—	—	4	4	4
	G neg.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

N = nariz G = garganta R.T.D. = "Routine Test Dilution"

portador permanente. Os resultados para a distribuição de freqüência de fagótipos obtidos estão no quadro IV.

QUADRO IV

Distribuição percentual de 12 padrões fagotípicos de *Staphylococcus aureus* obtidos a partir de 53 amostras.

Fagótipo	*Nº de vêzes em que ocorreu*	*%*
75	25	44,6
80	9	16,1
52/80	9	16,1
53/75/77	3	23,2
53/77	2	
77	2	
71	1	
52A/79	1	
81	1	
29/53/80	1	
42E/53/75/77	1	
6/7/47/53/54/73/75/77	1	

Verifica-se que o fagótipo 75 estêve presente em pràticamente metade das culturas. Cêrca de 80% das 56 amostras de estafilococos tipadas pertencem a 3 fagótipos apenas: 75, 80 e 52/80.

Para cada um dos três tipos de estafilococos acima referidos construiu-se um antibiograma médio. Para o tipo 75 desprezou-se o antibiograma correspondente à 6ª colheita do caso 10, visto ter ocorrido nessa ocasião a existência de 2 fagótipos simultâneamente, e portanto, o antibiograma obtido é teòricamente uma média dos antibiogramas de cada um dos tipos. Assim sendo, há 24 antibiogramas para o fagótipo 75, 9 para o fagótipo 80 e 9 para o fagótipo 52/80 e a soma dos graus de sensibilidade obtidos em cada antibiótico poderia alcançar um máximo teórico (se tôdas essas amostras fôssem muito sensíveis a êsse antibiótico) de 96 para o fagótipo 75 (24×4) e 36 para os fagótipos 80 e 52/80 (9×4). Foram calculados antibiogramas médios para cada fagótipo mais freqüente com os percentuais do grau teórico máximo de sensibilidade para o total de amostras de cada um dêles (quadro V). A figura 1 representa o gráfico dêsses 3 antibiogramas médios para efeito de mais fácil comparação.

QUADRO V

Sensibilidade aos antibióticos expressa pelos percentuais do grau teórico máximo de sensibilidade para o total de amostras de cada fagótipo mais freqüente (75, 80 e 52/80).

Fagótipo	*Antibiograma*										
	Penicilina	*Estreptomicina*	*Cloranfenicol*	*Aureomicina*	*Terramicina*	*Tetraciclina*	*Espiramicina*	*Eritromicina*	*Novobiocina*	*Kanamicina*	*Neomicina*
75	2,1	0	3,1	5,2	3,1	5,2	48,9	73,9	78,1	93,7	89,5
80	22,2	2,8	25,0	25,0	33,3	25,0	75,0	83,3	66,6	97,2	86,1
52/80	8,3	5,6	30,5	19,4	36,1	33,3	58,3	88,3	61,1	86,1	97,2

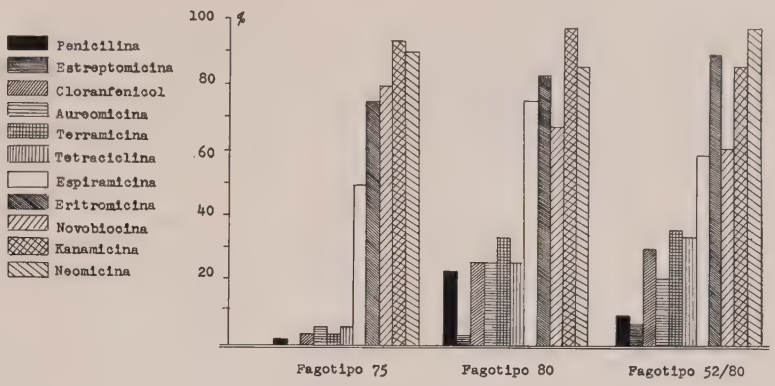


Fig. 1 Antibiograma médio para os fagótipos 75, 80 e 52/80, construído na base de 24 antibiogramas para o fagótipo 75, e 9 antibiogramas para os fagótipos 80 e 52/80. As colunas representam a eficiência "in vitro" de cada antibiótico para cada fagótipo expressa em percentagem da eficiência teórica máxima, para efeito de comparação. O grau de eficiência máxima é expresso por 96 para o fagótipo 75 (24×4) e por 36 para os fagótipos 80 e 52/80 (9×4).

COMENTÁRIOS

Pela análise de nossos resultados verifica-se, inicialmente, elevada percentagem de crianças portadoras de estafilococo patogênico. Sòmente 1 caso (7) apresentou culturas sistemàticamente negativas durante todo o período de observação. O caso 11 apresentou sòmente duas culturas positivas para um total de 16 colheitas (8 semanas) e poderia ser considerado portador ocasional. Oito casos (83,3%) eram portadores de estafilococo patogênico, 7 dêles, intermitentemente, e 1 dêles, permanentemente (caso 4). A julgar por êsses números, a contaminação na Clínica Pediátrica é grande, pelo menos no período em que realizamos o estudo, e aparentemente maior do que a existente 3 meses antes, embora não existam na Clínica Pediátrica várias das condições reconhecidas como fatôres predisponentes a grande contaminação [16].

Os portadores persistentes dividem-se em dois grupos [11]: a) portadores nos quais um mesmo fagótipo é encontrado persistentemente; b) portadores que apresentam sucessivamente diversos fagótipos. Colonização por um tipo altamente predominante obtivemos em apenas 3 casos (caso 2, a partir da 2ª semana; caso 3, a partir da 3ª semana; caso 6, a partir da 4ª semana). O caso 4 foi colonizado persistentemente por um estafilococo não-tipável, mas é provável que seja o mesmo em todo o correr da observação, a julgar pelos resultados do antibiograma. Nos demais casos a colonização ocorreu com grande variação de fagótipos.

A inspeção do quadro I mostra que, para um total de 78 culturas positivas para estafilococo, foram testadas em fagotipagem 68, tendo sido possível classificar 53, isto é, 77,9% dos estafilococos foram tipáveis. Das 53 culturas tipáveis foi possível isolar 56 fagótipos, pois em três ocasiões isolaram-se 2 fagótipos em uma só cultura (tôdas elas no caso 10). Os 56 fagótipos estão distribuídos por 12 padrões cuja freqüência percentual consta no quadro IV. Verifica-se que há um fagótipo evidentemente predominante que é o 75, pertencendo, como seria de se esperar, já que provém de um hospital, ao grupo III de COWAN. Os fagótipos 80 e 52/80 também ocorreram com muita freqüência. 76,8% dos estafilococos pertencem a apenas 3 fagótipos, um dêles (fagótipo 75) corresponde a 44,6% dos estafilococos isolados. Além disso, o fagótipo 75 estêve presente uma ou mais vêzes em 8 do total de 11 portadores reconhecidos. Do exposto resulta a conclusão muito importante de haver um fagótipo que predomina na Clínica Pediátrica do Hospital das Clínicas. Tal circunstância é considerada fator indispensável para o aparecimento de surtos epidêmicos [20].

Quanto aos antibiogramas das amostras obtidas, o aspecto geral é semelhante aos obtidos em trabalho anterior [12]. Em geral, encontramos resistência para penicilina, estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina; sensibilidade média para espiramicina e eritromicina; sensibilidade muito boa para novobiocina, kanamicina e neomicina. Entretanto, chama a atenção o aparecimento de não raras formas resistentes à novobiocina ou pouquíssimo sensíveis a ela. Tal fato não foi observado em nosso trabalho anterior [12]. Continuamos encontrando grande resistência ao cloranfenicol, em especial no fagótipo predominante (fagótipo 75), em contraste com outros trabalhos nos quais êste antibiótico tem-se mostrado muito bom contra o estafilococo [7, 8, 15 e 19].

Os antibiogramas médios para os 3 fagótipos principais são apresentados na figura 1, cuja inspeção revela antibiogramas semelhantes para os fagótipos 80 e 52/80 (fagótipos êsses que podem ser considerados em conjunto, segundo o Dr. R. E. O. Williams) e um antibiograma diferente para o fagótipo 75, caracterizado por grande resistência à penicilina, estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclinas.

Kanamicina e neomicina continuam sendo os antibióticos mais ativos, na dependência provável de seu pouco uso na Clínica. Kanamicina é utilizada em contadas ocasiões em virtude de sua ação tóxica [5], embora hajam trabalhos que demonstrem o contrário [14]. Neomicina é de pouca aplicação em virtude de ser administrada exclusivamente por via oral, e, como sua absorção é muito pobre, sua ação se limita a infecções intestinais, embora também possa ser usada tòpicamente. Para o fagótipo 75, os antibióticos realmente disponíveis e utilizáveis são novobiocina e eritromicina. Para os fagótipos 80 e 52/80 a espiramicina junta-se aos dois supracitados.

Os fagótipos 80 e 81 são ditos epidêmicos porque têm sido os tipos predominantes em inúmeras epidemias intra-hospitalares [18]. Verificamos que um dos tipos predominantes na Clínica é exatamente o tipo 80.

Ainda que a classificação dos estafilococos pelo antibiograma seja imprecisa [17], encontramos boa correlação entre fagotipagem e antibiograma, mostrando que êste último, mais acessível em nosso meio, pode até certo ponto ser útil no reconhecimento de amostras de estafilococos.

SUMMARY

Studies on the staphylococcal infections. II — Carrier incidence among hospitalized children; antibiogramme and phagetype of the strains isolated from weekly specimens.

The authors observed the carrier state of 12 children which were admitted for the first time to the Paediatric Ward of a General Hospital taking nose and throat exudate for the isolation of coagulase-positive staphylococcus, at weekly intervals during 9 weeks. The isolates were phagetyped (courtesy of Dr. R. E. O. Williams) and their sensitivity to 11 antibiotics was estimated. Only one of the children was consistently negative during the whole period of observation. Four of them were already carriers at the moment of admission, and, curiously enough, their phagetypes were 80 and 81. With regard to constancy of phagetype colonization, only four of the children could so be considered, although this did not occur from the first exudates. Twelve phagetype patterns were present with greater frequency of 75 (44.6%), 80 (16.1%) and 52/80 (16.1%). The mean antibiograms for these three phagetypes showed greater sensitivity to the antibiotics for phagetypes 80 and 52/80, than for phagetype 75; this later one is characterized by great resistance to penicillin, streptomycin, chloramphenicol and tetracycline.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a imprescindível colaboração prestada pelo Dr. R. E. O. Williams (do "Staphylococcus Reference Laboratory, Public Health Laboratory Service", Colindale, Londres), que, gentilmente, prontificou-se a determinar os fagótipos de nossas amostras de estafilococos; e o auxílio financeiro dos Laboratórios Lepetit, Pfizer Corporation do Brasil, Rhodia Brasileira, Pravaz R. Laboratórios S.A., Laboratórios Andrômaco, Lafi S.A., Lilly Laboratórios, Upjohn do Brasil e Squibb & Sons S.A.

REFERÊNCIAS

1. BALDWIN, J. N., RHEINS, M. S., SYLVESTER, R. F. & SHAFFER, T. E. — Staphylococcal infections in newborn infants. III — Colonizations of newborn infants by *Staphilococcus pyogenes*. A.M.A. Am. J. Dis. Children, **94**:107-116, 1957.

2. BLAIR, J. E. — Epidemiological implications of Staphylococcal phagetyping. Ann. New York Acad. Sc., **65**:152-159, 1956.

3. BLAIR, J. E. & CARR, M. — The bacteriophage typing of Staphylococci. J. infect. Dis., **93**:1-13, 1953.

4. BRANCH, A., STARKEY, D. H. & POWER, E. E. — The international situation with regard to the use of discs for antibiotic sensitivity tests. Antibiotics Ann., 1958-1959:833-835.

5. FINEGOLD, S. M. — Kanamycin. A.M.A. Arch. int. Med., **104**:15-28, 1959.

6. FINLAND, M. & JONES, W. F. Jr. — Staphylococcal infections currently encountered in a large Municipal Hospital: some problems in evaluating antimicrobial therapy in such infections. Ann. New York Acad. Sc., **65**: 191-205, 1956.

7. GRIFFITH, L. J. & OSTRANDER, W. E. — A comparison of the *in vitro* effectiveness of Kanamycin and nine other antibiotics against Staphylococci. Antibiotics, **9**:416-418, 1959.

8. GRIFFITH, L. J. & OSTRANDER, W. E. — One year's experience of the Staphylococcal Reference Laboratory, Batavia, New York. Antibiotics Ann., 1958-1959:938-941.

9. JACKSON, G. G., DOWLING, H. F. & LEPPER, M. H. — Bacteriophage typing of Staphylococci. I. Technique and patterns of lysis. J. Lab. & clin. Med., **44**:14-28, 1954.

10. KEEFER, C. S. — The impact of antibiotics on American Medicine. Antibiotics Ann., 1958-1959:32-37.

11. LEPPER, M. H., JACKSON, G. G. & DOWLING, H. F. — Characteristics of the Micrococcal nasal carrier state among hospital personnel. J. Lab. & clin. Med., **45**:935-942, 1955.

12. MACHADO, E. M., SOLÉ-VERNIN, C., ULSON, C. M., GOUVEIA, F. P., COELHO, H. S., CONCEIÇÃO, J. A. N., SILVA, J. A. & NEVES, F. P. Fº — Estudos sôbre as estafilococcias. I — Levantamento preliminar na enfermaria de Pediatria de um Hospital Geral: prevalência de portadores, antibiograma e fagotipagem das amostras obtidas. Rev. Hosp. clín., **15**:38-56, 1960.

13. OEDING, P. & SOMPOLINSKI, D. — On typing of *Staphylococcus aureus*: the relationship between typing according to phage patterns, serology and antibiograms. J. infect. Dis., **102**:23-34, 1958.

14. RILEY, H. D. — Kanamycin in staphylococcal and other infections of infancy and childhood. Antibiotics Ann., 1958-1959:623-627.

15. RIPPON, J. E. & VOGELSANG, T. M. — Carriage of pathogenic Staphylococci in the upper respiratory tract of children. Acta path. et microbiol. scandinav., **34**:284-296, 1956.

16. ROGERS, D. E. — Observations on the nature of staphylococcal infections. Bull. New York Acad. Sc., **35**:25-38, 1957.

17. SHAFFER, T. E., BALDWIN, J. N. & WHEELER, W. E. — Staphylococcal infections in nurseries. Advances Pediat., **10**:243-281, 1958.

18. COMMITTEE ON STAPHYLOCOCCAL PHAGE TYPING — Statement on availability and uses of Staphylococcal phage typing. Am. J. pub. Health, **49**:1185-1188, 1959.

19. VERGARA, L., ESCARZAGA, E., MORENO, M. A., GARCIA, R. & RUIZ-CASTAÑEDA, M. — Antibiograma del estafilococo en nuestro medio. Bol. med. Hosp. Infant., **14**:605-615, 1958.

20. WHEELER, W. E. — Staphylococcal infections. Pediatrics, **23**:977-979, 1959.

21. WILLIAMS, R. E. O., RIPPON, J. E. & DOWSETT, L. M. — Bacteriophage typing strains of *Staphylococcus aureus* from various sources. Lancet, i:510-514, 1953.

Recebido para publicação em 16 maio 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(3):140-146, maio-junho 1960

EMPRÊGO DE UM NOVO ANTIBIÓTICO (DEMETILCLORTETRACICLINA) NA MOLÉSTIA DE WEIL. RESULTADOS PRELIMINARES

Gildo Del Negro [1] e Dario Yabuta [2]

RESUMO

No presente trabalho são registrados quatro casos de moléstia de Weil tratados com um novo antibiótico de largo espectro, do grupo das tetraciclinas — o 7-cloro-6-demetilclortetraciclina ou demetilclortetraciclina — produzido por uma mutante do *Streptomyces aureofasciens* Duggar.

Nos quatro casos, o diagnóstico clínico de moléstia de Weil foi confirmado pela positividade da sôro-aglutinação específica, em título igual ou superior a 1/400. As doses totais de antibiótico empregadas foram, respectivamente, de 8,1 — 4,2 — 5,7 e 4,5 gramas. As melhoras subjetivas e objetivas foram rápidas. Não houve o aparecimento do segundo período febril nos três casos em que o tratamento se iniciou ao fim da primeira semana de doença; não ocorreram complicações; a tolerância pelo antibiótico foi ótima; e os quatro casos tiveram alta, curados, em condições satisfatórias.

INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da aureomicina (clortetraciclina) por Duggar, em 1948, numerosas pesquisas têm sido realizadas no sentido do desenvolvimento de novas raças de *Streptomyces aureofaciens*, com a finalidade da aquisição de novos conhecimentos sôbre os processos metabólicos que ocorrem na biossíntese dos antibióticos. De milhares de culturas assim realizadas, foi obtida recentemente uma amostra daquele *Streptomyces* capaz de produzir dois antibióticos até então desconhecidos, pertencentes ao grupos das tetraciclinas — a demetilclortetraciclina (DMCT) e a demetiltetraciclina (DMT). A identificação dêsses novos agentes, devida a McCormick & col.[12], ocorreu em 1957.

A demetilclortetraciclina, que difere da aureomicina pela ausência de um grupo metílico em sua fórmula química, mostrou-se altamente resistente à degradação pelos ácidos e álcalis e estudos preliminares indicaram que a administração oral da droga a indivíduos humanos produziam níveis sangüíneos mais elevados e mais duradouros que a tetraciclina. Daí sua maior potência de ação e, conseqüentemente, as doses muito menores usadas em clínica, quando comparadas às das demais tetraciclinas. Estudos realizados em animais de laboratório mostraram que o novo antibiótico tem toxicidade pràticamente nula, fato confirmado nas experimentações clínicas até aqui conhecidas. Trata-se de antibiótico absorvível pelo

Fac. Medicina da Univ. São Paulo — Inst. Med. Tropical — Clínica de Doenças Tropicais e Infectuosas (Prof. J. A. Meira).

(1) Assistente extranumerário.

(2) Doutorando interno.

tubo gastrintestinal, excretando-se lentamente pela urina. A dose média diária de demetilclortetraciclina para adultos é de 8 a 10 mg por quilo de pêso [1, 8, 11, 17, 18].

Numerosas pesquisas de ordem experimental e clínica têm sido efetuadas nestes três últimos anos com a nova droga [1, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 17, 18]. Numa avaliação geral sôbre a resposta *in vivo* de vários microrganismos à ação do antibiótico, SHAPIRO et al.[15] mostraram que a DMCT foi terapêuticamente eficaz em 85% das infecções nas quais o agente etiológico foi isolado e identificado. No relatório em aprêço, 259 amostras foram identificadas, pertencentes a 25 espécies diferentes de microrganismos patogênicos para o homem. Dêsses vinte e cinco, 15 responderam satisfatòriamente em todos os casos registrados e sòmente os gêneros *Proteus* e *Pseudomonas* responderam em menos de 2/3 dos casos. Infecções pelo *A. aerogenes* reagiram satisfatòriamente em 2/3 dos casos. E, de modo geral, acima de 50% de sucessos foram obtidos com todos os microrganismos, exceto duas espécies de estreptococo (o *S. anhemolyticus* e o *S. foecalis*), das quais se estudou um caso de cada. Os resultados clínicos coligidos por SHAPIRO & col. permitem, assim, concluir que a DMCT é, de modo geral, menos eficaz contra os microrganismos patogênicos do grupo entérico (*Coli, Proteus, Aerogenes* e *Pseudomonas*) do que contra aquêles habitualmente associados a infecções do aparelho respiratório, do trato geniturinário, etc., quando, então, é notàvelmente eficiente.

Na Clínica de Doenças Tropicais e Infecciosas do Hospital das Clínicas de São Paulo (Serviço do Prof. J. Alves Meira), estamos investigando atualmente a ação da demetilclortetraciclina em diferentes infecções *. No presente trabalho é nosso escopo apresentar os primeiros resultados obtidos com o novo antibiótico em 4 casos de leptospirose íctero-hemorrágica (moléstia de Weil), pois até aqui desconhecemos qualquer referência sôbre o assunto na literatura, no que diz respeito à investigação clínica. Existe uma referência de ordem experimental, devida a KUCK e REDIN [10], sôbre a ação protetora da demetilclortetraciclina contra infecção do embrião de galinha pela *L. ictero-hemorrhagiae*.

* O antibiótico (Demetilclortetraciclina) para êste e outros ensaios em andamento nos foi gentilmente cedido pelos Laboratórios Lederle.

SÚMULA DAS OBSERVAÇÕES

CASO 1 — Duas semanas antes da internação, êste paciente, de côr branca, com 57 anos de idade, que vinha trabalhando últimamente em retirar areia de rio, apresentou sùbitamente astenia, anorexia e dôres musculares, acompanhadas de febre. Cêrca de uma semana após surgiram vômitos e icterícia com bilirrubinúria e obnubilação mental. O exame físico revelou tratar-se de paciente em mau estado geral, com temperatura de 38ºC, pulso 100/min., pressão arterial 120×80, icterícia rubínica, intensamente desidratado e em pré-coma. A palpação do baço e do fígado não foram possíveis. As bulhas eram rítmicas, mas hipofonéticas; pulmões normais. Ausência de sinais de meningite.

Os exames de laboratório revelaram os seguintes resultados: *Hemograma* — Hb. 91%, leucócitos 20.400/mm³, neutrófilos jovens 2, bastonetes 8, segmentados 77, eosinófilos 0, linfócitos 10, monócitos 3. *Urina* — pigmentos biliares: positivo; urobilinogênio 1/40; hemácias 15/campo; leucócitos 50/campo; cilindros granulosos presentes. *Uréia no sangue* — 620 mg/100 ml. *Bilirrubinemia total* — 9,0 mg/100 ml de sôro. *Provas funcionais do fígado* — Hanger ++, turvação do timol 4,8 unidades McLagan, floculação do timol +. *Mucoproteínas no sôro* — 6,6 mg/100 ml. *Transaminase G-O* — 160 U/ml.

O quadro clínico, os exames de laboratório e a positividade da reação de sôro-aglutinação para *Leptospira ictero-hemorrhagiae* a 1/800 em 1-3-60 e a 1/1600 quatro dias depois, permitiram estabelecer o diagnóstico de moléstia de Weil.

Evolução e tratamento — No dia imediato ao da internação foram notadas várias petéquias na parede abdominal. Foi iniciado nesse dia tratamento com a demetilclortetraciclina — 900 mg nas primeiras 24 horas, isto é, 300 mg de 8 em 8 horas e, em seguida, 600 mg ao dia, 300 mg de 12 em 12 horas — tendo sido suspensa a droga 13 dias depois. Deve ser assinalado que imediatamente após a internação foram administradas ao paciente, por via venosa, 10 milhões de unidades de penicilina em 1000 ml de sôro glicofisiológico. No dia imediato a penicilina foi suspensa, iniciando-se a demetilclortetraciclina. Em 9-3-60, sete dias depois do início da medicação, começou a haver regressão da icterícia. O paciente não mais teve febre desde o dia em que iniciou a demetilclortetraciclina e durante

os 34 dias de internação. A evolução da ureia sangüínea foi a seguinte: 2-3-60 — 620 mg; 5-3 — 462 mg; 7-3 — 372 mg; 10-3 — 153 mg; 22-3 — 62 mg; 30-3 — 46 mg. O paciente teve alta curado em 4-4-60 (ver tabela I).

Caso 2 — Êste paciente, de côr branca, operário braçal, com 18 anos de idade, seis dias antes da internação acordou pela manhã com febre, cefaléia, astenia e dôres pelo corpo, predominantemente nos membros inferiores. No terceiro dia de doença, a sintomatologia se intensificou e em seguida apresentou náuseas e vômitos. Não notou ictericia. Referiu contato com ratos no local de trabalho e negou passado mórbido de importância. O exame físico mostrou indivíduo com escleróticas intensamente ictéricas e conjuntivas hiperemiadas. Regular estado geral, abatido mas consciente. Temperatura de 37ºC, pulso 84/min., pressão arterial 110×90. Icterícia generalizada e presença de petéquias ao nível da arcada ilíaca direita, parede abdominal e dorso. A compressão das massas musculares das coxas e panturrilhas despertava dor. Fígado a 1 dedo do rebordo costal e baço apenas percutível. Ausência de sinais neurológicos de comprometimento das meninges.

Os exames de laboratório revelaram os seguintes resultados: *Hemograma* — leucócitos 22.000/mm³, sendo neutrófilos jovens 2%, bastonetes 19, segmentados 61, eosinófilos 0, linfócitos 11 e monócitos 6. *Urina* — pigmentos biliares presentes, urobilinogênio 1/50, albumina 4 g/1000 ml, hemácias 1/campo, leucócitos 4/campo e cilindros granulosos presentes. *Uréia no sangue* (17-3-60) — 43 mg%. *Sôro-aglutinação para leptospirose* em 9-3 positiva a 1/1800 e em 16-3 negativa. *Provas funcionais do fígado* — Hanger ++, turvação do timol 5,2 U McLagan. *Mucoproteínas no sôro* — 10,2 mg%. *Transaminase G-O* — 410 U/ml.

A hipótese de moléstia de Weil sugerida para o caso se confirmou pela leucocitose, pelas alterações urinárias, pela elevada taxa de mucoproteínas no sangue e pela positividade da sôro-aglutinação para *L. ictero-hemorrhagiae*.

Evolução e tratamento — A temperatura vespertina do paciente era de 37ºC no dia da internação. Nesse mesmo dia foi iniciada medicação com demetilclortetraciclina na dose de 300 mg cada 6 horas (nas primeiras 24 horas) e em seguida 300 mg cada 12 horas. O paciente não mais apresentou temperatura acima de 36º,8C durante todo o período de internação. O antibiótico foi administrado apenas durante 6 dias (dose total 4,2 g) em virtude de rápida regressão dos sintomas. O paciente teve alta, curado, 14 dias após a internação (ver tabela I).

Caso 3 — Êste paciente deu entrada em 15 de março de 1960 com história de febre, calafrios, cefaléia, anorexia e astenia — sintomatologia que se iniciou abruptamente uma semana antes da internação. No 4º dia de doença surgiram urinas bilirrubinúricas e a febre diminuiu de intensidade. Apresentou vômitos e diarréia. Trabalha em ambiente úmido, onde há ratos em abundância. Ao exame físico: regular estado geral, afebril, bradipsíquico, com acentuada icterícia das escleróticas, pulso 74/min., pressão arterial 120×60. Fígado a 2 dedos do rebordo costal, baço não aumentado. Um exame de urina revelou alterações acentuadas (pigmentos biliares +, albumina 15 g‰, hemácias 10/campo, leucócitos 80/campo e cilindrúria), despertando a suspeita de moléstia de Weil. O quadro clínico de início abrupto, as alterações urinárias, a uremia de 417 mg%, os resultados da determinação de transaminase (160 U/ml) e mucoproteínas (6,8 mg%) no sôro sangüíneo e a sôro-aglutinação para *L. ictero-hemorrhagiae* positiva a 1/400 confirmaram o diagnóstico.

Evolução e tratamento — Dois dias após a internação foi instituído tratamento com a demetilclortetraciclina, na dose de 900 mg nas primeiras 24 horas e em seguida 300 mg cada 12 horas, durante 8 dias. Em 23 de março o paciente sentia-se subjetivamente bem, com apetite, embora ainda ictérico. A icterícia começou a regredir em 28-3, quando foi suspensa a medicação. A evolução do quadro clínico e laboratorial foi muito favorável. Não ocorreu recaída e o paciente teve alta curado, 28 dias após a internação (tabela I).

Caso 4 — Êste paciente, de 34 anos de idade, pescador, sujeito a freqüentes contatos com ratos, adoeceu bruscamente uma semana antes da internação, com cefaléia, tonturas, febre e calafrios. Surgiram ainda dôres musculares, distúrbios neuropsíquicos, acentuada anorexia e vômitos. Urinas bilirrubínicas e icterícia. Ao dar entrada na Enfermaria, a temperatura era de 38º,6C, pulso 104/min., pressão arterial 105×70 e icterícia rubínica. Notaram-se, ainda, hiperemia conjuntival, herpes labial, fígado a 1 dedo do rebordo e ausência de esplenomegalia e de sinais neurológicos. A sôro-aglutinação para *L. ictero-hemorrhagiae* foi positiva a 1/1.600. O *hemograma* revelou 12.200 glóbulos brancos, com 16% de bastonetes e 74% de segmentados, 1% de eosinófilos, 7% de linfócitos e 2% de monócitos. *Exame de urina* com pigmentos biliares presentes, urobilinogênio a 1/50, hemácias 3/campo, leucócitos 15/campo e cilindrúria. *Uréia no sangue*: 122 mg%, bilirrubinemia total de 6,0 mg%. *Mucoproteínas*: 9,15 mg%.

Evolução e tratamento — No dia imediato ao da internação foi instituído tratamento com a demetilclortetraciclina: durante 5 dias, 600 mg por dia (300 mg de 12 em 12 horas) e nos 5 dias seguintes apenas 300 mg por dia (150 mg de 12 em 12 horas). A evolução dêste caso foi excelente, tendo o paciente se tornado afebril em 24 horas e com rápidas melhoras subjetivas. O paciente teve alta, curado, 18 dias após a internação, tendo sido examinado em Ambulatório 8 dias depois, achando-se em ótimas condições de saúde (tabela I).

TABELA I

Moléstia de Weil e demetilclortetraciclina — Evolução e tratamento.

Demetilclortetraciclina (Cápsula de 150 mg)					*Tempo de desaparecimento da febre após início da medicação*	*Recidiva*	*Quadro clínico do paciente à admissão*	*Resultado*
Caso	*Data do início*	*Dose diária*	*Dose total (g)**	*Duração*				
1	2-3-1960 3-3-1960	300 mg c/ 8 h. 300 mg c/12 h.	8,100	1 dia 12 dias	12 horas	Não	Grave	Curado
2	9-3-1960 10-3-1960	300 mg c/ 6 h. 300 mg c/12 h.	4,200	1 dia 5 dias	Após o início da droga, a temperatura não mais atingiu 37ºC.	Não	Benigno	Curado
3	8-3-1960 17-3-1960	900 mg em 24 h. 300 mg c/12 h.	5,700	1 dia 8 dias	Afebril	Não	Mediana gravidade	Curado
4	26-3-1960	300 mg c/12 h. 150 mg c/12 h.	4,500	5 dias 5 dias	1 dia	Não	Mediana gravidade	Curado

* Efeitos colaterais não foram observados em nenhum dos 4 casos.

COMENTÁRIOS

Embora seja difícil avaliar o real efeito terapêutico dos diferentes antibióticos conhecidos e já experimentados na moléstia de Weil, particularmente quando se atua na segunda fase da doença, isto é, após o período inicial de leptospirosemia, nota-se, em publicações recentes, a ênfase com que os autores recomendam o emprêgo de antibióticos em seu tratamento [3, 6, 19]. Assim, a penicilina [2, 3, 16], a clortetraciclina [2, 13], a oxitetraciclina [14] e a tetraciclina [5] têm sido usadas com aparente sucesso, quer em grupos de pacientes, quer em observações isoladas.

Apesar do otimismo de alguns autores quanto às vantagens do emprêgo dos antibióticos na moléstia de Weil — exceção feita a HALL & col.[7], que acreditam não terem os antibióticos qualquer efeito apreciável no tratamento das leptospiroses — verificamos ser ainda elevada, entre nós como alhures, a mortalidade devida àquela moléstia. Em atualização sôbre o assunto, recentemente publicada por VERONESI & CORRÊA [20], verifica-se que o índice de mortalidade por doença de Weil no Hospital das Clínicas de São Paulo é de 25%. De nossa parte, analisando os 15 últimos casos de leptospirose internados na Clínica de Doenças Tropicais e Infecciosas dêsse Hospital (não incluídos aí os quatro que constituem objeto do presente trabalho), computamos quatro casos de óbito (26,6%), não obstante a terapêutica antibiótica administrada.

Tratando-se, portanto, de moléstia infecciosa com elevada mortalidade e conhecendo-se, por outro lado, a atividade *in vitro* e *in vivo* dos antibióticos de largo espectro derivados da tetraciclina sôbre a *L. icterohemorrhagiae*, estão plenamente justificados ensaios clínicos com novos antibióticos daquele grupo na doença de Weil. É o caso da demetilclortetraciclina.

O único estudo experimental de nosso conhecimento a respeito da ação da demetilclortetraciclina sôbre a *Leptospira ictero-hemorrhagiae* é o de KUCK *e* REDIN [10], os quais realizaram interessante pesquisa, comparando o novo antibiótico com a tetraciclina, com base na dosagem requerida para efeito terapêutico contra infecções experimentais de embriões de galinha. Verificaram aquêles autores que a demetilclortetraciclina era mais eficaz que a tetraciclina em proteger embriões de galinha contra a *L. ictero-hemorrhagiae*. O "quociente de atividade" da demetilclortetraciclina sôbre a *Leptospira* em relação à tetraciclina foi, naquela experiência [10], de 2,3. Êsse quociente é obtido dividindo-se a "dose mediana eficaz" de tetraciclina pela "dose mediana eficaz" de demetilclortetraciclina, entendendo-se por "dose mediana eficaz" aquela requerida para proteger 50% de animais contra infecções bacterianas letais.

GSELL [6] usou como critérios clínicos para avaliar o efeito de um antibiótico na leptospirose os seguintes: a) prevenção da segunda fase de febre (que ocorre geralmente na 2ª semana de doença); b) prevenção de meningite serosa (2ª semana); c) duração total da febre.

A evolução dos quatro casos pode ser considerada excelente, com base nos critérios de GSELL e ainda pela rápida regressão dos sintomas subjetivos, pela progressiva e rápida melhora das alterações urinárias e da taxa de uréia sangüínea e pela não ocorrência de recaída.

Dos 4 casos, o de n.° 1 pode ser classificado como grave, pela idade do paciente (57 anos), pela intensa uremia (620 mg%), pela desidratação e pela presença de sintomas neuropsíquicos. Com base nos mesmos critérios, os casos 3 e 4 eram de mediana gravidade, sendo que no caso 3 predominavam as alterações renais. O caso 2, pela idade do paciente (18 anos) e pelas alterações renais e gerais, pode ser considerado benigno. *Todos eram da forma ictérica da moléstia* e os quatro tiveram alta, curados, em ótimas condições gerais.

Para terminar êstes comentários, desejaríamos chamar a atenção para dois fatos relacionados ao antibiótico em si. O primeiro diz respeito à dose. Graças à "clear-

ance" renal baixa do novo antibiótico [11], é possível obter-se atividade maior e mais prolongada no sangue e, dest'arte, doses significantes menores que as dos demais antibióticos de largo espectro e de uso comum em clínica podem ser empregadas, com resultados comparáveis. As cápsulas de demetilclortetraciclina são dosadas a 150 mg. Em nossos casos, a dose média diária foi de 600 mg (300 mg de 12 em 12 horas) e as doses totais respectivamente 8,1 g, 4,2 g, 5,7 g e 4,5 g (tabela I). Estas doses totais são incomparàvelmente menores que as doses totais de aureomicina (33 g), terramicina (55 g) e tetraciclina (17 g) usadas em casos semelhantes [13, 14, 5]. O segundo fato digno de nota é que a tolerância pelo medicamento foi ótima, pois em nenhum dos casos houve efeitos colaterais indesejáveis, como náuseas, vômitos, diarréia ou sintomas de natureza alérgica.

SUMMARY

The use of a new antibiotic (demethylchlortetracycline) in Weil's disease. Preliminary results.

Four patients with Weil's disease were treated with a new broad spectrum antibiotic belonging to the tetracycline group — the 7-chloro-6-demethylchlortetracycline. This new antibiotic was obtained from a mutant strain of *Streptomyces aureofaciens* Duggar in 1957, at the Lederle Laboratories in New York.

The clinical diagnosis of Weil's disease in the four patients was confirmed by positive agglutination test for *Leptospira icterohemorrhagiae* in titers equal to or above 1:400. The total dosage range of the antibiotic was 4.2 to 8.1 grams. The four patients improved quickly; no second week febrile period appeared in any patient; complications did not occur; no side effects were noticed, and all four patients were discharged in fair good health.

REFERÊNCIAS

1. Improving antibiotic performance — Editorial do British Med. J., 31 janeiro 1959, pp. 287-288.

2. BATCHELOR, T. M. & TODD, G. M. — Aureomycin and penicillin therapy in leptospirosis (Weil's disease). J.A.M.A., **143**:21-22, 1950.

3. DICK, J. M. & ROBINSON, J. F. — Penicillin in the treatment of 84 cases of Leptospirosis in Malaya. J. Royal Army Med. Corps, **103**:186-197, 1957.

4. DIERMEIER, H. F. & KANEGIS, L. A. — Demethylchlortetracycline: toxicity studies in rats and dogs. No prelo.

5. FERREIRA, J. M. & ROCHA, H. — Tetraciclina no tratamento da moléstia de Weil. A propósito de um caso. Rev. bras. Med., **12**:285-287, 1955.

6. GSELL, von O. — Antibioticatherapie der Leptospirosen. Schweizer. Med. Woch., **89**: 422-431, 1959.

7. HALL, H. E.; HIGHTOWER, J. A.; RIVERA, R. D.; BYRNE, R. J.; SMADEL, J. E. & WOODWARD, T. E. — Evaluation of antibiotic therapy in human leptospirosis. Ann. Int. Med., **35**:981-998, 1951.

8. HIRSCH, H. A. & FINLAND, M. — Antibacterial activity of serum of normal subjects after oral doses of demethylchlortetracycline, chlortetracycline and oxytetracycline. New England J. Med., **260**:1099-1104, 1959.

9. KANEGIS, L. & DEARBORN, E. H. — Serum concentrations and urinary excretion of antibacterial activity following oral or intravenous administration of demethylchlortetracycline, tetracycline or chlortetracycline to dogs. No prelo.

10. KUCK, N. A. & REDIN, G. S. — Comparison of demethylchlortetracycline with tetracycline in the control of experimental infections in mice. No prelo.

11. KUNIN, C. M. & FINLAND, M. — Demethylchlortetracycline, a new tetracycline antibiotic that yields greater and more sustained antibacterial activity. New England J. Med., **259**:999-1005, 1958.

12. McCORMICK, J. R. D.; SJOLANDER, N. O.; HIRSCH, U.; JENSEN, E. R. & DOERSHUK, A. P. — A new family of antibiotics: the demethyltetracyclines. J. Am. Chem. Soc., **79**:4561-4563, 1957.

13. MEIRA, J. A. & BLOISE, W. — Aureomicina no tratamento da moléstia de Weil. Rev. Med. Cir. São Paulo, **11**:23-38, 1951.

14. MEIRA, J. A.; VERONESI, R. & TARTARI, T. A. — Moléstia de Weil. A propósito de um caso tratado com terramicina. Rev. Hosp. Clín., **8**:1-9, 1953.

15. SHAPIRO, J.; TABACHNICK, E. & MONAHAN, J. P. — Declomycin (Demethylchlortetracycline) development, chemistry, bacteriology and pharmacology. Editado por M. Seelig, Lederle Laboratories, Pearl River, New York, 1960.

16. SUCHETT-KAYE, A. I. — Penicillin in Weil's disease. Lancet, **1**:90-92, 1951.

17. SWEENEY, W. M.; HARDY, S. M.; DORNBUSH, A. C. & RUEGSEGGER, J. M. — Demethylchlortetracycline: a clinical comparison of a new antibiotic compound with chlortetracycline and tetracycline. Antibiotics & Chemother., **9**:13-22, 1959.

18. TUNEVALL, G. & FRISK, A. R. — Bacteriological and clinical evaluation of demethylchlortetracycline. 7º Simpósio Anual sôbre Antibióticos, Washington, 4-6 de novembro, 1959. No prelo.

19. VAN THIEL, P. H. — The treatment of leptospiroses, especially Leptospirosis icterohaemorrhagica, with some antibiotics. Doc. de Med. Geogr. et Tropica, **9**:309-324, 1957.

20. VERONESI, R. & CORRÊA, M. O. A. — Leptospiroses. Atualização do assunto, particularmente das recentes pesquisas realizadas em São Paulo. Rev. Hosp. Clín., **14**:11-24, 1959.

Recebido para publicação em 4 maio 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(3):147-154, maio-junho 1960

NUCLEOTIDE AND POLYNUCLEOTIDE SYNTHESIS IN *TRYPANOSOMA CRUZI*

V — Effects of primaquine, stylomycin derivatives and analogs, on experimentally infected mice

G. E. S. Moraes [1], J. Lopes Faria and J. F. Fernandes

SUMMARY

The treatment of mice infected experimentally with *T. cruzi* by the aminonucleoside of stylomycin and primaquine was found to be very effective. The association of the drugs bringing about:

1. Total survivals of the infected animals when 100% of death occurred among the untreated animals.
2. Remarkable lowering or absence of blood parasitism.
3. Pronounced favourable histopathological effects on the infection of the heart and skeletal muscles and no toxic effects on the tubular cells of the kidney.

The effect of each drug administered separately was found to be less pronounced than the association, and in addition necrotic changes of the renal tubular cells were observed after the prolonged administration of the aminonucleoside of stylomycin.

Very little (if any) chemotherapeutic effect was found when the animals were treated with the N_6 diethyl analogue of stylomycin or the N_6 dimethyladenine.

INTRODUCTION

The discovery by Hewitt *et al.*[6] that the antibiotic stylomycin * exerts a pronounced trypanostatic activity against *Trypanosoma equiperdum* and a variable activity against *Trypanosoma cruzi* has aroused considerable interest. They showed that the antibiotic was very effective against experimental mouse infection by *T. equiperdum*, and Tobie [9] found a similar effectiveness of the drug against six species of African trypanosomes in mice. Hewitt *et al.*[5] showed furthermore that the chemotherapeutic effects of stylomycin and its aminonucleoside derivative on *T. equiperdum* could be reversed by purines, suggesting that the drug might interfere in some way with the meta-

Fac. Medicina Univ. São Paulo. Laboratório de Fisiologia Celular. This investigation was supported by grants from The Rockefeller Foundation, Conselho Nacional de Pesquisas and Ministério da Saúde.

(1) Fellow of CAPES. Assistant of Department of Histology and Embryology, Faculdade de Medicina de Pôrto Alegre.

* Stylomycin is the trade name of Lederle Laboratories Division, American Cyanamid Co., for the antibiotic formerly known as Achromycin. This name was changed subsequently to Puromycin and afterwards to Stylomycin.

bolism of purines of the parasite. These findings stimulated further studies on how *T. cruzi* makes its purine compounds, in order to get more fundamental knowledge and incidentally to apply it as a rational basis for a chemotherapeutic approach.

Following this line, FERNANDES & CASTELLANI [2] have shown that the usual forms of *T. cruzi* as obtained in cultures on the common diphasic media, cannot make the purine ring, using therefore preformed bases to build up their purine nucleotides and polynucleotides. They showed furthermore that the antibiotic stylomycin did not inhibit this utilization of preformed purines. On the other hand, a fragment of the antibiotic, its aminonucleoside, was found to inhibit the synthesis of the purine compounds (FERNANDES & CASTELLANI [1]) by the same form of parasites. Furthermore, on the intracellular forms found in the cycle of the parasite in tissue cultures, this compound acts promoting an intense and remarkable degeneration of the reproductive forms of this protozoon (SILVA, YONEDA & FERNANDES [8]). The effect of this drug in experimental mice infection was found to be very pronounced FERNANDES, PEREIRA & SILVA [3]) as detected by the lowering of the blood parasitism and by the prevention of death in the treated animals. The surviving animals, however, were found to harbor the parasite.

Since the most remarkable effect of the aminonucleoside of stylomycin appeared to be on the intracellular leishmania in tissue culture, and primaquine (PIZZI [7]) seems to act on the extracellular form, an assay associating both drugs was undertaken. The present paper is concerned with the results obtained assaying this association, and observations on the infected animals tolerance for the aminonucleoside of stylomycin as well as the effects of one analogue and one derivative of this aminonucleoside, namely N_6 diethylaminonucleoside and N_6 dimethyladenine respectively, on the experimental mice infection by *T. cruzi*.

MATERIAL AND METHODS

Young mice weighing around 15 g (12-17 g) were inoculated intraperitoneally with a virulent strain of *T. cruzi* (500,000 organisms to each mouse). The treatment started 3 hours after the inoculation and prolonged up to 68 days except in the period between the 21st and 38th day of infection. Each mouse received 4 daily injections (subcutaneously) of the drug assayed or saline throughout the treatment schedule. The daily doses used per Kg of body weight were: aminonucleoside (26 mg), N_6 diethylaminonucleoside (17 mg), N_6 dimethyladenine (15 mg) and primaquine (13 mg). We must add that on a molecular basis an equal dose of the aminonucleoside of stylomycin, its N_6 diethyl analogue and N_6 dimethyladenine were employed. Unless when indicated the treatment schedule and technique for blood parasite counting and xenodiagnosis was the one reported by FERNANDES, PEREIRA & SILVA [3]. Four criteria were used to evaluate the effectiveness of the treatment: blood level parasitism; the amount of intracellular parasites in heart and skeletal muscles; the histopathological reactions in these organs and kidneys and the survival time of the infected animals. For the histopathological studies 30 animals were used. All 5 animals of the untreated group were examined soon after their death, which occurred 13 to 15 days after the infection by *T. cruzi*. From nine mice treated with dimethyladenine, 5 were examined after deaths that occurred 13, 16, 20, 20 and 26 days after the injection and the remaining 4 were sacrificed 14, 14, 14 and 74 days after the *T. cruzi* inoculation. Nine animals treated with the aminonucleoside of stylomycin were examined. In order to follow the drug toxicity to the kidneys, 3 animals were sacrificed on the 14th day of infection and the remaining 6 were examined after sacrifice on the 74th day after the *T. cruzi* inoculation. All 3 animals treated with primaquine were sacrificed on the 14th day of infection. Four animals were examined among those treated with primaquine plus the aminonucleoside of stylomycin. Three of them were sacrificed on the 14th day and 1 on the 31st day of infection. The technique used was Bouin fluid fixation after which fragments of heart, skeletal muscle of 2 or 3 different regions and half of each kidney were embedded in paraffin. From the heart 2 transverse fragments of the whole organ

were taken, one at the level of the atrium and the other at the superior part of the ventricles.

RESULTS

The effects of the drugs on the survival time as well as on the number of blood parasites are indicated in Table I. It can be observed that the diethyl analogue of the aminonucleoside and N_6 dimethyladenine affect very little the evolution of the infection as judged by the survival time of the mice infected. However, N_6 dimethyladenine seems to lower the blood parasitism. On the other hand, the aminonucleoside of stylomycin and primaquine were found to be very effective since no deaths occurred among the animals treated with either drug. It can be seen that during the treatment period primaquine seems to be more effective than the aminonucleoside of stylomycin, in relation to the cleaning up of the blood parasite. Once the drug administration is withdrawn, the level of blood parasites rises in those animals previously treated with primaquine, thus confirming the results showing that the drug affects mainly the extracellular parasites (Pizzi [7]). On the other hand, those animals treated with the aminonucleoside of stylomycin showed very few parasites in their blood, even after the withdrawal of treatment. However, the animals continue to harbor blood parasites as found through xenodiagnosis, confirming in this way the results of Fernandes, Pereira & Silva [3]. The association of the aminonucleoside of stylomycin seemed to be highly effective because the blood parasitism must be very low, since in only one out of 5 mice was it found to be positive through xenodiagnosis.

TABLE I

Chemotherapy of experimental infection in mice by *Trypanosoma cruzi*. Each group consists of ten mice and each animal received four daily injections of the indicated drugs, from three hours after inoculation up to 68 days after, except for the period between the 21st. and 38th. day.

Drugs (mg/kg body weight/ day)	*Survival*		*Number of parasites per mm³ of blood on the indicated days after the inoculation*				*Xeno-diagnosis (on the 70th. day of infection)*
	% of survivors	*Average survival time in days*	9th.	14th.	32th.	57th.	
Controls (saline)	—	12.5	8,400	17,000 (1 animal)	(*)	(*)	...
N_6 diethyl analogue (17 mg)	20	14.0	4,700	1,220	Positive 100%	Positive 100%	...
N_6 dimethyladenine (15 mg)	20	18.6	435	650	Positive 100%	Positive 100%	...
Aminonucleoside of stylomycin (26 mg)	100	(**)	180	53	Positive 100%	Positive 50%	...
Primaquine (13.3 mg)	100	(**)	20	15	275	Positive 90%	...
Aminonucleoside + Primaquine	100	(**)	—	—	—	Negative 100%	Negative Negative Negative Positive

(*) No mice alive at is time.
(**) All survivors appeared healthy when they were killed after four months of infection with *T. cruzi*.

TABLE II

Intracellular parasites and histopathological findings in mice infected by *Trypanosoma cruzi* and treated with primaquine, aminonucleoside of stylomycin and N_6 dimethyladenine. The extension of the histopathological findings as well as the intensity of the intracellular parasitism is directly proportional to the number of plus (+).

Treatment	*No. of mice*	*Heart*		*Skeletal muscle*		*Kidney tubular necrosis cortical atrophy*
		Amount of intracellular parasites	*Inflammatory reaction*	*Amount of intracellular parasites*	*Inflammatory reaction*	
Control	5	++++	+++	++	+	—
Dimethyladenine	9	++++	++++	++	+	—
Amino on the 14th. day of treatment	3	+++	++	—	+	—
Amino on the 74th. day of treatment	6	—	+	—	+	+++
Primaquine	3	+	++	—	+	—
Amino + Primaquine	4	—	—	—	—	—

The histopathological findings are registered in Table II. We found the following picture among the untreated animals (control): *heart* — the parasitism of the cardiac muscle fibers was very marked in all mice except 1 which showed a moderate number of parasites (Fig. 1). The inflammatory reaction was not intense, being focal and slight, or diffuse and moderate in degree. It was made up of lymphocytes, monocytes and histiocytes with rare fibroblasts and neutrophil leucocytes. The areas with more marked cellular infiltration showed dissociation and destruction of the myocardial fibers; *skeletal muscles* — the parasitism of the muscle fibers was of slight (2 mice) or moderate (3 mice) degree and the inflammatory reaction was inconspicuous or not observed; *kidneys* — only nuclear pyknosis of a few cells of the convoluted tubules was observed.

Dimethyladenine treated animals: *heart* — the same findings as in the control animals, but with slight parasitism in 2 mice, 1 dying on the 26th day after the inoculation and the other sacrificed on the 74th day. In these 2 animals the inflammatory reaction presented more numerous fibroblasts; *skeletal muscles* — the parasitism was in most cases of slight degree. However, in 1 case it was moderate and in another marked. Inflammatory reaction was similar to control animals, being, however, less frequent and in moderate degree; *kidneys* — convoluted tubules with the same nuclear pyknosis as seen in the control group, being more frequent, however, in 4 animals.

Aminonucleoside of stylomycin: we found among the 3 animals sacrificed on the 14th day after the *T. cruzi* inoculation: the parasitism and the inflammatory reaction in the heart were less intense than in controls; skeletal muscles did not present parasites and the kidneys showed no changes. The animals sacrificed on the 74th day after the *T. cruzi* inoculation presented: *heart* — only in 1 of the 6 mice rare parasites were found in the myocardial fibers. A slight focal inflammatory reaction was present in 4 mice and failed to be observed in 2 (Fig. 2). This reaction was constituted by rare and small foci of lymphocytes and monocytes

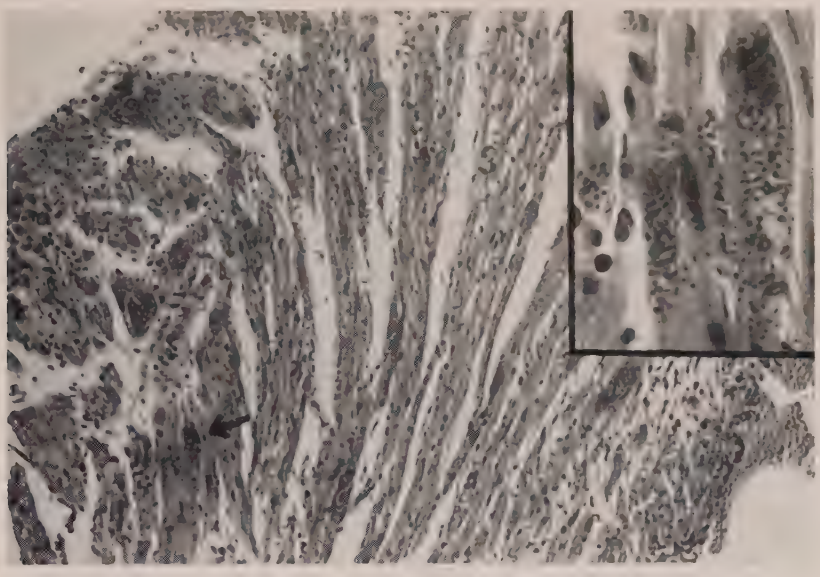


Fig. 1 — Control animal (15 days after the Trypanosoma *inoculation). Notice the high parasitism of the myocardial fibers. Hematoxylin and eosin stain. ×136. At the right upper corner detail of the myocardial fibers seen near the left lower corner (arrow). ×544.*

Fig. 2 — Animal treated with aminonucleoside (74 days after the Trypanosoma *inoculation). Section at about the same level of the Fig. 1 showing a normal picture of the myocardium. Hematoxylin and eosin stain. ×136.*

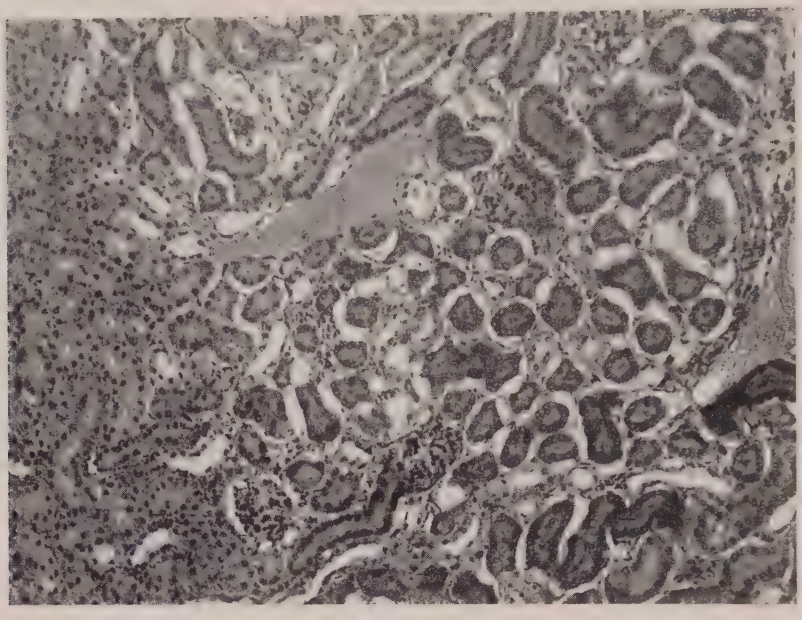


Fig. 3 — Animal of the same group of the Fig. 2. At right, atrophy of the renal tubules with interstitial fibroblastic proliferation. Hematoxylin and eosin stain. ×148.

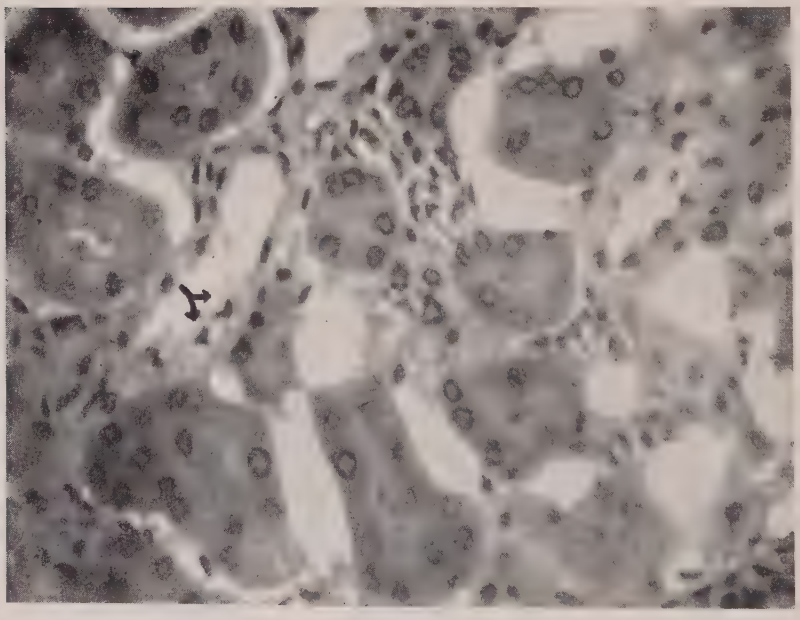


Fig. 4 — Detail of the anterior figure, showing nuclear pyknosis of the tubular cells at left (×) and interstitial fibroblastic proliferation. ×592.

scattered in the myocardium, and it was more conspicuous in the case with parasites. In one of the 2 cases without inflammation the myocardium presented a few small scars; *skeletal muscles* — no parasitism, and the inflammatory reaction as in the heart; *kidneys* — the cortex was diffusely loosened and edematous with widening of the interstitial spaces and fibroblastic proliferation. This picture was of moderate degree in 4 animals and slight in 2. A few cortical tubules presented necrosis of single cells and nuclear pyknosis of other elements (Figs. 3, 4). Also other elements of the proximal and distal convoluted tubules and Henle's loop showed basophilic cytoplasm and normal nuclei. The cells of the collecting tubules presented no changes. Rare epithelial cells and acidophilic networks in the tubular lumina were seen. Small foci of round cells seen in 2 mice only. No thickening of the basement membrane of the glomerular capillaries was observed.

Primaquine treated animals: *heart* — rare parasitism of the myocardial fibers in 2 mice and none in the others: slight focal inflammatory reaction of round cells; *skeletal muscles* — in 2 examined mice an inflammatory reaction as in the heart was observed, but without parasites; *kidneys* — no changes could be found.

Animals treated with primaquine plus aminonucleoside: *heart* — no parasites were found; rare and small lymphocytic foci were observed in 1 animal only; *skeletal muscles* — no changes; *kidneys* — the cells of the convoluted tubules presented rare nuclear pyknosis, which was more frequent in 1 mouse. Thickening of the basement membrane of the glomerular capillaries was not seen.

DISCUSSION

There is a widespread opinion among the workers dealing in Chagas disease, that the failure to find an efficient chemotherapy seems to be due to the high resistance of its ethiologic agent when in the intracellular stage of its evolutive cycle. This situation is really unfortunate, because the parasite multiplication forms are just the intracellular leishmania, that become of course, the target which the chemotherapist aims to hit. The association of a drug whose site of action seems to be on the intracellular leishmania (aminonucleoside) with another drug remarkably effective against the extracellular parasites (primaquine) seems to be very promising.

The histologic examination of the heart and skeletal muscles (the tissues with greater parasitism) confirmed the parasitologic findings. All the animals, but one, treated with the aminonucleoside showed, on the 74th day after the *Trypanosoma* inoculation, no leishmania in the heart and skeletal muscles. At this time the inflammatory reaction in these organs was slight or absent. A more conspicuous action of the treatment was observed in the animals receiving aminonucleoside and primaquine in which no parasites and generally no inflammatory reaction were present.

The kidneys of the animals receiving the aminonucleoside for a longer time (74 days) presented necrotic changes of the tubular cells and interstitial fibroblastic proliferation. This effect, possibly due to the action of the drug on the renal tubules, was not observed in the animals sacrificed earlier (14-31 days). The nuclear pyknosis found in a few tubular cells of the control animals and in animals treated with dimethyladenine is probably due to the trypanosomiasis itself. A thickening of the glomerular basement membrane as observed by others (Frenk *et al.*[4]), was not seen in any group of animals.

No doubt exists as to trying the treatment of human Chagas disease with primaquine. The toxicity of this drug is very well known, while that of the aminonucleoside of stylomycin is not known in relation to man. However, while waiting for a really effective treatment for Chagas disease it seems of interest to try the association of drugs we report in this paper, once a careful criterion for toxicity is followed. Unpublished results from this laboratory (J. P.

M. PEREIRA, personnal communication) have shown very little, if any, toxicity of the aminonucleoside of stylomycin to bone marrow. However, the renal toxicity of the drug to mice and rats requires careful control when assayed in man, especially if the treatment is prolonged.

The ineffectiveness of the N_6 diethyl analogue of stylomycin seems to indicate the essentiality of the methyl group in N_6 of the purine ring. The inefficacy of N_6 dimethyladenine is a further indication of the role of the pentose amine moiety of the molecule in the activity of the drug.

RESUMO

Síntese de nucleotídio e polinucleotídio em "Trypanosoma cruzi". V. Efeitos da primaquina, derivados e análogos da estilomicina, sôbre camundongos infectados experimentalmente.

Camundongos jovens foram inoculados com uma cêpa virulenta de *Trypanosoma cruzi* e tratados com primaquina, isoladamente ou em associação com o aminonucleosídio da estilomicina, o seu N_6 dietil derivado e também com N_6 dimetiladenina. Os seguintes resultados foram observados nos animais tratados com primaquina e aminonucleosídio da estilomicina:

1. Sobrevivência de todos os animais tratados enquanto ocorreu 100% de morte entre os animais não tratados.

2. Número insignificante ou ausência de flagelados no sangue circulante.

3. Efeitos histopatológicos nìtidamente favoráveis sôbre os músculos cardíacos e esqueléticos e nenhum sinal de toxicidade da droga para o rim, quando o tratamento com o antipurínico não era demasiadamente prolongado.

4. Quando as drogas eram administradas isoladamente os efeitos acima enumerados eram menos pronunciados.

5. N_6 dietil análogo do aminonucleosídio bem como a N_6 dimetiladenina se mostraram pràticamente sem ação na infecção experimental de camundongos pelo *Trypanosoma cruzi*.

REFERÊNCIAS

1. FERNANDES, J. F. & CASTELLANI, O. — Nucleotide and polynucleotide synthesis in *Trypanosoma cruzi*. II. *In vitro* effect of tioguanine and of the aminonucleoside of stylomycin. Exper. Parasitol., **8**:480-485, 1959.
2. FERNANDES, J. F. & CASTELLANI, O. — Nucleotide and polynucleotide synthesis in *Trypanosoma cruzi*. I. Precursors of purine compounds. Exper. Parasitol., **7**:224-235, 1958.
3. FERNANDES, J. F.; PEREIRA, J. P. M. & SILVA, L. H. P. — Nucleotide and polynucleotide synthesis in *Trypanosoma cruzi*. IV. Effect of the aminonucleoside of stylomycin on mouse infections. Exper. Parasitol., **8**:496-501, 1959.
4. FRENK, S.; ANTONOWICZ, I.; CRAIG, J. M. & METCOFF, J. — Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside. Renal lesions and body electrolyte composition. Proc. Soc. exper. Biol. & Med., **89**:424-427, 1955.
5. HEWITT, R. I.; GUMBLE, A. R.; WALLACE, W. S. & WILLIAMS, J. H. — Experimental chemotherapy of trypanosomiasis. IV. Reversal by purines of the *in vivo* activity of puromycin and an aminonucleoside analog, against *Trypanosoma equiperdum*. Antibiotics & Chemother., **4**:1222-1227, 1954.
6. HEWITT, R. I.; WALLACE, W. S.; GUMBLE, A. R.; GILL, E. R. & WILLIAMS, J. H. — Experimental chemotherapy of trypanosomiasis. III. Effect of achromycin against *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma cruzi*. Amer. J. trop. Med. & Hyg., **2**:254-266, 1953.
7. PIZZI, T. — Effect of primaquine on experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Proc. Soc. exper. Biol. & Med., **78**:643-644, 1951.
8. SILVA, L. H. P.; YONEDA, S. & FERNANDES, J. F. — Nucleotide and polynucleotide synthesis in *Trypanosoma cruzi*. III. Effect of the aminonucleoside of stylomycin on the parasite in tissue culture. Exper. Parasitol., **8**:486-495, 1959.
9. TOBIE, E. J. — Effect of puromycin on six species of *Trypanosoma in mice*. Amer. J. trop. Med. & Hyg., **3**:852-859, 1954.

Recebido para publicação em 4 maio 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(3):155-162, maio-junho 1960

"IN VITRO" EFFECT OF THE AMINONUCLEOSIDE OF STYLOMYCIN AND DIMETHYL-ADENINE AGAINST *TOXOPLASMA GONDII*

L. H. Pereira da Silva [1]

SUMMARY

The aminonucleoside of Stylomycin and the purine base of the antibiotic, dimethyl-adenine, show considerable toxic activity against *Toxoplasma gondii* in tissue culture. The analogs inhibit the reproduction of the parasite and determine total disintegration of the intracellular parasites without degeneration of the host cells. No reversion of the drug action was obtained by the use of adenine, adenosine and desoxyadenosine.

INTRODUCTION

The action of the aminonucleoside of Stylomycin against *Trypanosoma cruzi* has been recently described, by Fernandes *et al.*[4, 15]. The drug has an inhibitory effect on the incorporation of adenine into the nucleic acid of cultural forms of the parasite, interferes with the mitotic process and determines degeneration of its intracellular leishmanial stages in tissue culture.

On the other hand, the activity of Stylomycin had been demonstrated some years ago against both *T. cruzi* and *Toxoplasma gondii* infections in mice (Sonntag & Kloetzel [16], Pizzi *et al.*[14], Christen & Thiermann [1], Eyles & Coleman [3]). This analogy suggested to us the idea of studying the effect of the aminonucleoside of Stylomycin on *Toxoplasma*. Our investigations were prompted by the assumption that the aminonucleoside fraction of the antibiotic molecule might be responsible for the antitoxoplasmic activity of the drug. Apparently, this is the case in trypanosomiasis (Fernandes & Castellani [4], Hewitt *et al.*[7], Tobie & Highman [17]).

Results obtained with the aminonucleoside on *Toxoplasma* infected tissue cultures are henceforth presented.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed on HeLa cells cultures and trypsinized calf kidney tissue, both maintained in stationary test tubes with flying coverslips. The nutrient medium for HeLa cells consisted of Hanks' balanced solution with 0.25% lactoalbumin hydrolysate (Nutritional Biochemical Corp.) and 10% sheep serum inactived at 56°C for 30 minutes. For trypsinized calf kidney, calf serum was used instead of sheep's. Penicillin and Streptomycin were added in final concentrations of 200 U.O./ml and 0.05 mg/ml each. The nutrient medium was adjusted to pH 7.2-7.4 with sodium bicarbonate and distributed in amounts of 1.5 ml for each culture tube.

The aminonucleoside of Stylomycin * and the whole antibiotic were supplied by Lederle Lab. Division, American Cyanamid

Fac. Med. Univ. São Paulo — Dep. Parasitologia (Prof. A. D. F. Amaral).

(1) Assistant.

* Stylomycin is the trade mark of the antibiotic formely named Achromycin and afterwards Puromycin (Lederle Lab. Div., American Cyanamid Co.).

Co. Dimethyl-adenine was obtained through acid hydrolysis (1N-HCl) of the aminonucleoside in boiling water bath for 1 hour. In some experiments we tried to counteract the effect of the aminonucleoside by using adenine (Sigma), adenosine and desoxyadenosine (Nutritional Biological Corp.). All drugs were prepared in concentrated solutions in Hanks' and sterilized in Seitz filters.

By means of preliminary tests, using noninfected tissue cultures, the toxic levels of the drugs were established.

The parasite used was the "N" strain of *Toxoplasma gondii*, originally isolated by NOBREGA [13] and maintained in our laboratory through successive transfers every 2-3 days, in mice.

The tissue cultures were infected, after 3-7 days incubation at 37°C, with a saline suspension of peritoneal exudate taken from mice with a 2-day infection. To each culture tube was added 0.1-0.2 ml of exudate suspension, an amount which was made to contain 4 to 6×10^6 extracellular toxoplasmas, according to prior countings in a Neubauer haemocytometer. The tubes were then incubated for another 6-8 hours, after which the nutrient medium was substituted for a new one containing the drug (or drugs) to be tested. Sometimes the drug was added together with the parasites.

The antitoxoplasmic activity of the drug was estimated, through microscopic examination of the coverslips stained by Giemsa, on the basis of: 1) proportion of infected to uninfected cells; 2) number of parasites within infected cells; 3) morphological aspect of parasites and host cells. For each test, equal number (3 to 6) of control (untreated) and treated preparations, were used.

RESULTS

With a 0.03 to 0.05 mM concentration, which has been used in almost all the experiments, the aminonucleoside of Stylomycin did not seem to harm the tissue cells, even after 5 days of contact. In higher concentrations it causes some inhibition of the mitotic process, as indicated by the accumulation of metaphase figures. A total degeneration of the tissue cells occurred after 6 days of contact with the drug when this was used at a 0.6 mM concentration.

Stylomycin is much more toxic for the cells than its aminonucleoside moiety. Even at 0.03 mM, it causes very rapid degeneration of the cells. This fact prevented us from testing the antitoxoplasmic activity of the whole antibiotic on tissue cultures. Since dimethyl-adenine is less toxic than the aminonucleoside we compared both drugs in equal molar concentrations of 0.03 mM.

1. *Effect of the aminonucleoside of Stylomycin against "Toxoplasma"* — With 0.03 to 0.05 mM concentrations, the aminonucleoside markedly inhibited reproduction of the intracellular parasites and caused their progressive degeneration. The first morphological signs of such action appeared after 2 days with a swelling of the parasites and the appearance of many eosinophilic granules in their cytoplasma. Around the 60th hour, we observed many parasites with a picnotic nucleus. Later, the nuclei appeared split in fragments (karyorrhexis) (Figs. 5 and 6). At this time, there was a significant difference in the averages of parasites per parasitized cells, between treated and control cultures (Table I). After 4 days practically all parasites found in treated cultures were degenerate (Figs. 7 and 8). In many, the degree of disintegration was such that they would not be recognized as toxoplasmas if it were not by comparison with a few neighbouring forms showing earlier stages of degeneration. Because of this fact it was sometimes difficult to count the parasites. However the contrast in number between the treated and the control cultures was so obvious that a precise count was superfluous. Table I compares the treated with the control cultures. In the treated cultures the parasites stayed at the

TABLE I

Effect of the aminonucleoside of Stylomycin against *Toxoplasma* in HeLa cells. (final concentration of the drug — 0.03 mM)

Group	*Time of fixation after infection (in hours)*	*Number of slides*	*Number of parasitized cells counted*	*Frequency of the indicated nuber of toxoplasmas per cell*									
				1-2		3-4		5-10		11-20		> 20	
				N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Experimental	60	3	174	106	61.0	59	34.0	7	4.0	2	1.0	—	—
(Treated)	120	3	161	100	62.0	48	30.0	13	8.0	—	—	—	—
Control	60	2	103	33	32.0	22	21.5	29	28.0	14	13.5	5	5.0
(Untreated)	120	4	245	12	5.0	15	6.0	18	7.0	51	21.0	149	61.0

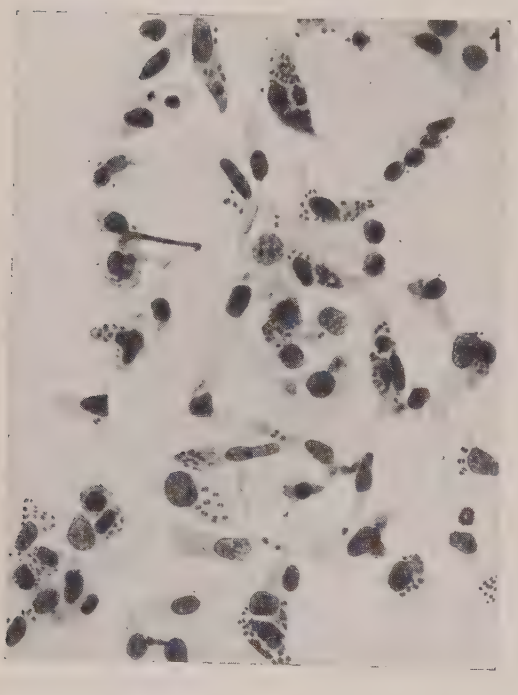
same quantitative levels from the 60th to the 120th hour after addition of the drug. However in the control cultures there was a marked increase in number (Figs. 1 to 4).

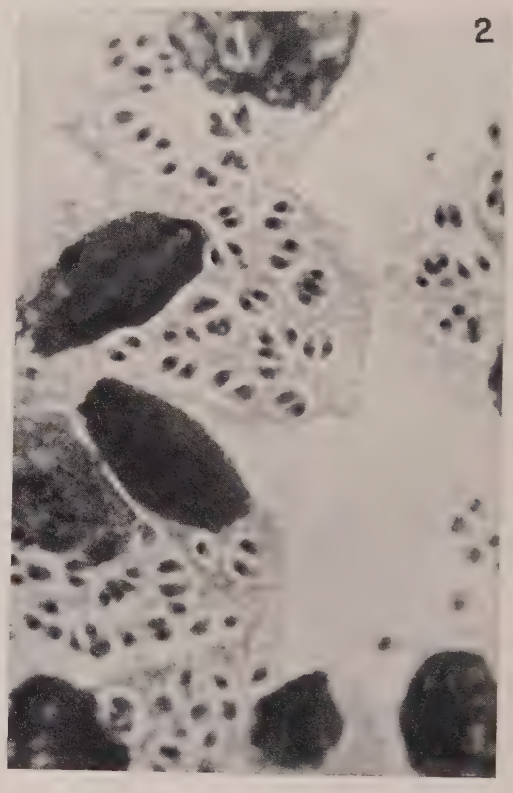
Apparently the degree of degeneration presented by the toxoplasmas was related to the number inside a given cell. In other words, the heavier the parasite load within a cell, the more intense the degeneration of the parasites. Moreover, it seems that, if not heavily parasitized, the host cells are able to survive the degenerative process suffered by the parasites. This phenomenon was observed with many cells of an entirely normal aspect, presenting only an eosinophilic area surrounding the disintegrating toxoplasmas. On the other hand, the cell itself degenerates if loaded with a large number of degenerating parasites.

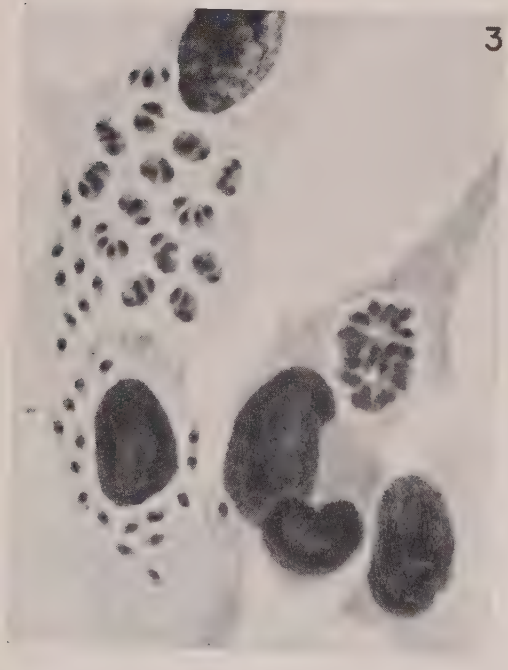
If both the aminonucleoside and the infective material were added together to the tissue cultures, many parasites were found within the tissue cells, 6 to 12 hours later. This seems to indicate that the drug does not interfere with the penetration of the parasite into the cells.

2. *The action of dimethyl-adenine against "Toxoplasma"* — In two experiments, dimethyl-adenine was added to the nutrient medium in final concentration of 0.03 mM. The purine base showed a remarkable antitoxoplasmic action in tissue culture, since, as the aminonucleoside, it inhibited the intracellular reproduction of the parasites and caused them to degenerate within a few days (Figs. 9 and 10). Although we could not compare the effect of both drugs in quantitative terms, we have the impression that the aminonucleoside is more active than its purine base, since in equal molar concentrations the degeneration of parasites occurs earlier with the aminonucleoside.

3. *Experiments on the reversion of the aminonucleoside activity* — In other experiments we tried to counteract the effect of







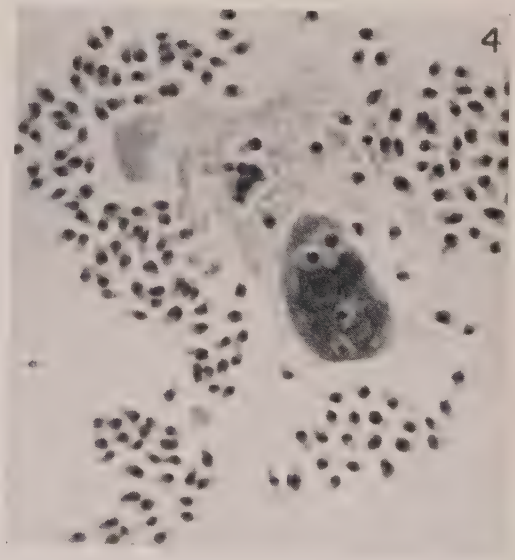
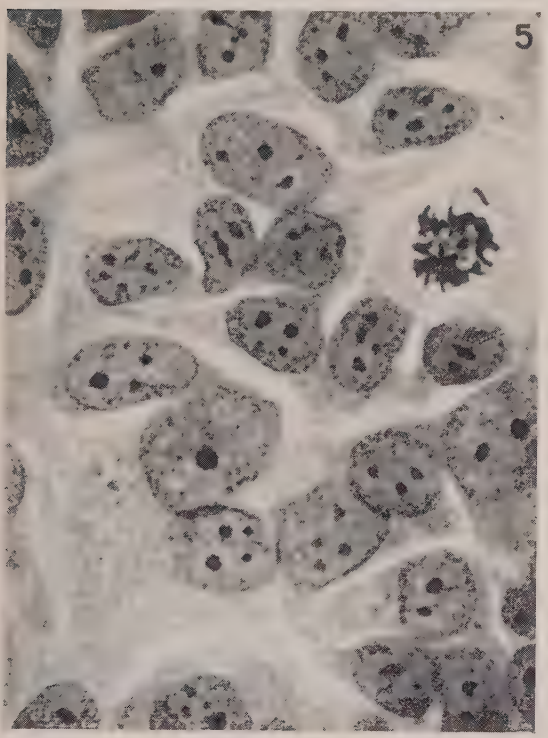
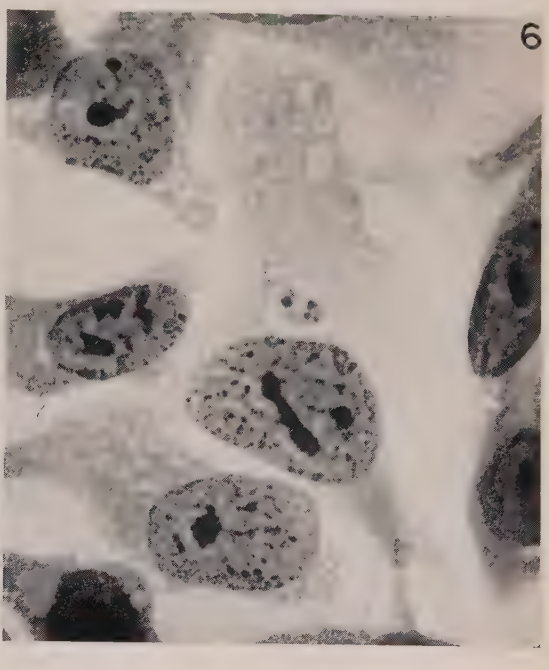


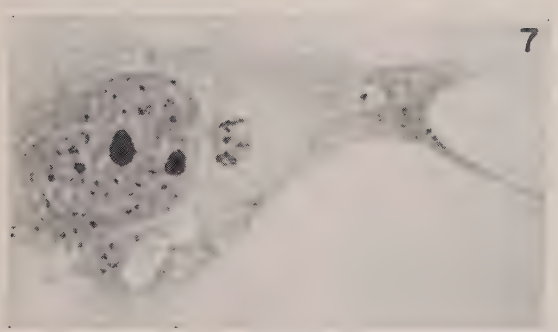
Fig. 1-4 — Tissue culture (HeLa cell) infected with Toxoplasma gondii, *in the 4th day of infection. Fig. 1 — Low power (×300) showing almost all cells parasitized. Fig. 2 & 3 — Parasites loading the cytoplasm of culture cells (×1,500); notice normal structure of parasites. Fig. 4 — Disintegration of parasitized cell with liberation of intracellular toxoplasmas (×1,500).*

the aminonucleoside of Stylomycin against *Toxoplasma*, by adding adenine, adenosine or desoxyadenosine, together with the aminonucleoside, to the nutrient medium of infected cultures. No reversal of the toxic effect against the parasite was demonstrable when these metabolites were used in a 10-fold ratio with the aminonucleoside.

For the purpose of discrimination one experiment was performed using a 30-fold ratio, i.e., 0.03 mM of aminonucleoside and 0.9 mM of adenine. The controls showed







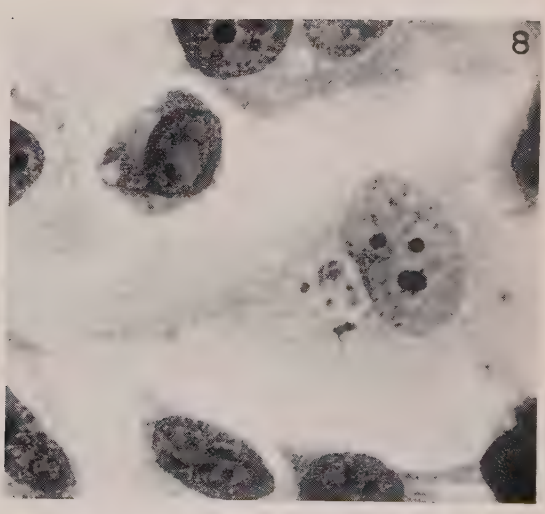


Fig. 5-8 — Effect of the aminonucleoside of Stylomycin against Toxoplasma gondii. *Fig. 5 — Parasitized tissue culture showing degenerated parasites (low, left) after 2 days of drug action (×1,000). Fig. 6 — Same, showing parasites in karyorrhexis (×1,500). Fig. 7 & 8 Parasitized cells after 4 days of drug action, showing disintegration of toxoplasmas (×1,500).*

a toxic ativity of adenine alone against the tissue cells, but even so, the parasites found within normal cells of adenine-control culture tubes, were abundant and structurally normal after 4 days of contact. However in the adenine-aminonucleoside preparations the degeneration of the parasites progressed in the same way as observed in the absence of the metabolite.

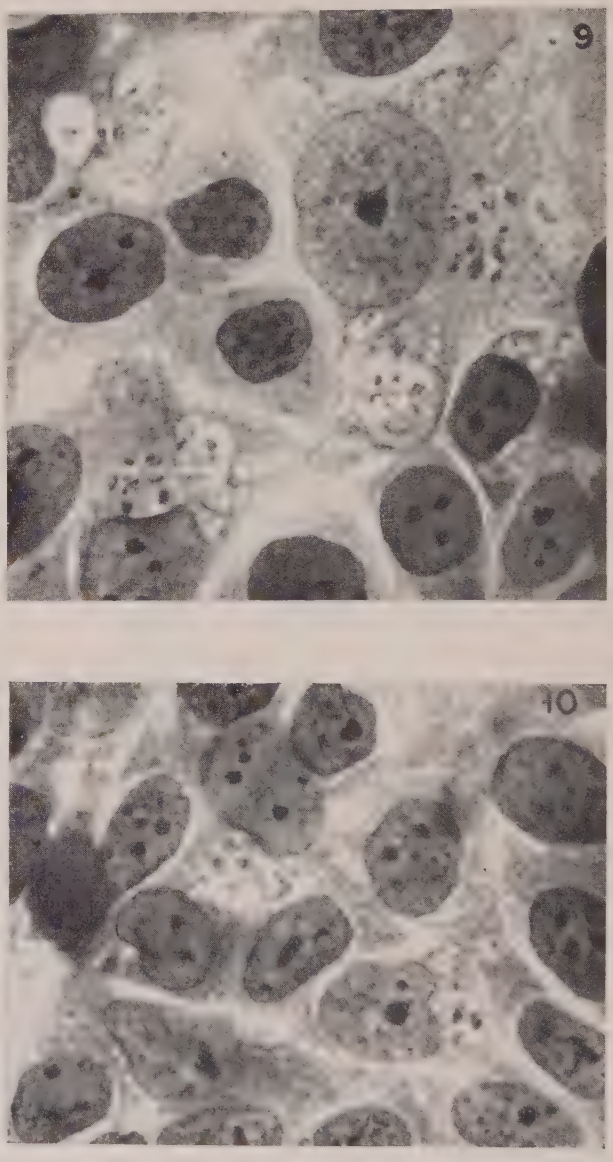


Fig. 9-10 — Effect of dimethyl-adenine against Toxoplasma gondii. *Fig. 9 & 10 — Parasitized tissue culture showing advanced degeneration of toxoplasmas after 4 days of drug action (×1,500).*

DISCUSSION

The results of our experiments indicate that the aminonucleoside moiety of Stylomycin is responsible for the antitoxoplasmic activity. Dimethyl-adenine, the purine base of the antibiotic, also has a toxic effect against *Toxoplasma* but it is of a lower degree. This difference in effectiveness between aminonucleoside and dimethyl-adenine was previously observed with *Trypanosoma cruzi* (Fernandes, Moraes & Silva, unpublished data).

As we can see in the review by Hutchings [8], the activity of the intact molecule of the antibiotic against bacteria, *Entamoeba histolytica* and some worms, is not presented by the aminonucleoside moiety, but, on the other hand, this is, on a molar basis, more active against trypanosomes and the mammary adenocarcinoma of the C_3H mouse. The activity against *Trypanosoma equiperdum* may be altered by structural changes in the dimethyl radicals of the 6-position of the purine ring.

Both the aminonucleoside and the dimethyl-adenine base seem to be active only during the reproduction phase of the parasite. Inhibition of parasite division was marked, even before any degenerative phenomena were apparent. There is also interference with the mitotic process, as indicated by the fact that we have often seen bi-nucleated parasites, although this occurrence is less frequent than in the case of *Trypanosoma cruzi* (Silva *et al.*[15]).

On the other hand, the drug seems to be innoxious to extracellular parasites and does not inhibit their penetration into the cells. When parasites were added to cultures with drug-containing nutrient medium, no dif-

ferences could be found in the proportion os parasitized to free cells between control and treated cultures, 6 to 12 hours after contact with the drug.

The toxicity of the aminonucleoside for HeLa cell is higher than for embryonic chicken cells (SILVA *et al.*[15]), as it would be expected from the known activity of the drug against some tumors (TROY *et al.*[apud 8]). However, we do not believe that the demonstrated effect against the parasite is the indirect result of the drug's action against the cells, because we have considered only the degeneration of toxoplasmas harboured by cells with a normal aspect. Also, we have noticed that the disintegration of parasites is not usually accompanied by the degeneration of host cells, unless the number of intracellular parasites is very large. Furthermore we followed many infected cultures for more than 10 days after the drug had been removed and we could observe a good cellular growth with the absence of parasites. In contrast, the control infected cultures degenerated in a few days, due to parasitic action. Finally in non cancerous cells, namely trypsinized calf kidney tissue, the same effect of the drug against the parasite was demonstrated.

From the known data on trypanosomiasis we could expect the drug to act as antagonist of purine nucleotide metabolism. No conclusive data concerning the mechanism of anti-toxoplasmic activity could be evaluated from our experiments on reversion, but the toxic effect on dimethyl-adenine agrees with this hypothesis. Actually, if the purine base is normally found in a little proportion in *Aerobacter aerogenes* and *Escherichia coli's* R N A (LITTLEFIELD & DUNN[11]) it seems reasonable to assume that it can be abnormally metabolized by other organisms.

Since 2-6-diaminopurine has some inhibitory effect on the reproduction of *Toxoplasma* (COOK[2]) and dimethyl-adenine has a toxic effect against the parasite, the search for other purine analogs with chemotherapeutic value against the parasite might be rewarding. A positive result in this field would be important because previously the most effective drugs against the parasite — sulfonamides and pyrimethamine — act on the same metabolic sequence (FRENKEL & HITCHINGS[5]), i.e., antagonizing the synthesis of the formil-donor coenzyme, which is so important in many biochemical reactions, particularlw in the "de novo" biosynthesis of purine nucleotide (GREENBERG & JAENICKE[6]). The possibility of acting on another metabolic process of the parasite that is, on the "salvation pathway" for nucleotide synthesis (KORNBERG[9]) or purine containing coenzymes synthesis, would be of great interest for the treatment of toxoplasmosis. In the chemotherapy of experimental leukemia and cancer, for example, and in the action against several bacteria, very favorable results have been obtained with the association of anti-folic and purine analogs (NICHOL[12], LACEY[10]).

RESUMO

Ação "in vitro" do aminonucleosídio da Estilomicina e da dimetiladenina contra o "Toxoplasma gondii".

O autor estuda a ação do aminonucleosídio da Estilomicina e da dimetil-adenina sôbre o *Toxoplasma gondii* em cultura de tecido. Ambas as drogas demonstraram ação tóxica intensa sôbre o parasita, principalmente o aminonucleosídio, avaliada pela inibição da reprodução e degeneração progressiva até lise total dos parasitas intracelulares. Nas concentrações até 0,05 mM ativas contra o *Toxoplasma*, não houve degeneração das células da cultura.

Os resultados parecem indicar que a fração aminonucleosídio é a fração ativa do antibiótico contra o *Toxoplasma*, mas não se conseguiu reversão da ação tóxica contra o parasita, pelo emprêgo de adenina, adenosina e desoxiadenosina, nada podendo se adiantar, portanto, quanto ao mecanismo de ação dêste análogo de purina.

REFERENCES

1. CHRISTEN, A. R. & THIERMANN, I. E. — Quimioterapia experimental de la toxoplasmosis. II. Efecto de la acromicina sobre la toxoplasmosis experimental del ratón. Bol. Inform. parasit. chil., **8**:49-51, 1953.

2. COOK, M. K. — The inhibitory effect of adenine and related compounds on the pro-

liferation of *Toxoplasma gondii* in tissue culture. J. Parasitol., **44**:274-279, 1958.

3. EYLES, D. E. & COLEMAN, N. — The antitoxoplasmic activity of puromycin. Antibiot. & Chemother., **4**:649-652, 1954.

4. FERNANDES, J. F. & CASTELLANI, O. — Nucleotide and polynucleotide synthesis in *Trypanosoma cruzi*. II. *In vitro* effect of tioguanine and of the aminonucleoside of stylomycin. Exper. Parasitol., **8**:480-485, 1959.

5. FRENKEL, J. K. & HITCHINGS, G. H. — Relative reversal by vitamins (p-aminobenzoic, folic, and folinic acids) of the effects of sulfadiazine and pyrimethamine on *Toxoplasma*, mouse and man. Antibiot. & Chemother., **7**:630-638, 1957.

6. GREENBERG, G. R. & JAENICKE, L. — On the activation of the one carbon unit for the biosynthesis of purine nucleotides. Ciba Found. Symp., 1957. p. 204-232.

7. HEWITT, R. I.; GUMBLE, A. R.; WALLACE, W. S. & WILLIAMS, J. H. — Experimental chemotherapy of trypanosomiasis. IV. Reversal by purines of the *in vivo* activity of puromycin and an amino nucleoside analog, against *Trypanosoma equiperdum*. Antibiot. & Chemother., **4**:1222-1227, 1954.

8. HUTCHINGS, B. L. — Puromycin. Ciba Found. Symp., 1957. p. 177-188.

9. KORNBERG, A. — Pathways of enzymatic synthesis of nucleotides and polynucleotides. Symposium on the chemical basis of heredity. Baltimore, 1957. p. 579-608.

10. LACEY, B. W. — Mechanisms of chemotherapeutic synergy. Symp. Soc. gen. Microbiol., 8th, London, 1958. p. 247-287.

11. LITTLEFIELD, J. W. & DUNN, D. B. — Natural occurrence of thymine and three methylated adenine basis in several ribonucleic acids. Nature, London, **181**:254-255, 1958.

12. NICHOL, C. A. — Studies on resistance to folic acid antagonists. Henry Ford Hospital International Symposium, 5th (The Leukemias...), Detroit, 1957. p. 583-604.

13. NOBREGA, P.; TRAPP, E. E. & GIOVANNONI, M. — Toxoplasmose epizoótica em coelhos. Ação da sulfadiazina. Ciênc. & Cult., **4**:134-135, 1952.

14. PIZZI, P. T.; PRAGER, S. R. & KNIERIM, T. F. — Ensayos de quimioterapia de la enfermedad de Chagas experimental. XII. Acción de la puromicina sola y asociada a la primaquina. Bol. Inform. parasit. chil., **8**: 77-79, 1953.

15. SILVA, L. H. P. da; YONEDA, S. & FERNANDES, J. F. — Nucleotide and polynucleotide synthesis in *Trypanosoma cruzi*. III. Effect of the aminonucleoside of stylomycin on the parasite in tissue culture. Exper. Parasitol., **8**:486-495, 1959.

16. SONNTAG, R. & KLOETZEL, J. — Tratamento da infecção experimental de camundongo pelo *Trypanosoma cruzi* com acromicina. Folia clin. & biol., **20**:133-138, 1953.

17. TOBIE, E. J. & HIGHMAN, B. — Influence of the aminonucleoside of puromycin on course and pathology of trypanosome infections in rabbits and mice. Am. J. trop. Med. & Hyg., **5**:504-515, 1956.

Recebido para publicação em 25 abril 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(3):163-170, maio-junho 1960

COR PULMONALE CRÔNICO ESQUISTOSSOMÓTICO

II — Alguns aspectos das lesões vasculares pulmonares causadas pelos ovos de *S. mansoni*

Ely CHAVES [1]

RESUMO

O autor estuda alguns aspectos das lesões vasculares pulmonares, causadas pelos ovos de *S. mansoni*, em 6 casos de *cor pulmonale* crônico esquistossomótico, autopsiados no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas, de Salvador, Bahia. Entre as principais alterações identifica as reações vasculares necrosantes, relacionando-as com prováveis fenômenos de hipersensibilidade específica, frente a toxinas elaboradas pelos miracídios. Descreve uma reação tissular muito característica, a qual denomina de alveolite circunscrita eosinofílica, circundando geralmente algumas lesões vasculares necrosantes de natureza esquistossomótica. Confirma a existência de fístulas arteriovenosas esquistossomóticas, descrevendo um novo mecanismo de sua formação através do tecido de granulação da reação esquistossomótica intra-arterial, sucedendo geralmente à necrose da parede do vaso, determinada pelos ovos de *S. mansoni*.

INTRODUÇÃO

Após o trabalho de SHAW & GHAREEB [21], em 1938, têm surgido na literatura numerosas publicações [2, 4, 14, 16, 17, 18, 20, 25], endossando a opinião daqueles autores que consideraram a arteriolite obliterante como a lesão fundamental, responsável pelo aparecimento da síndrome clínica cardiopulmonar, observada em pacientes com *cor pulmonale* crônico esquistossomótico. JAFFÉ [13], em 1939, estudando 3 casos com alterações vasculares pulmonares esquistossomóticas, referiu-se a lesões fibróticas da íntima, determinando oclusão ou redução do lume vascular, não admitindo serem as mesmas causadas pela seqüela da arteriolite necrosante, determinadas pelos ovos de *S. mansoni*, como já salientara anteriormente SHAW & GHAREEB [21], invocando, para explicá-las, um mecanismo alérgico dependente de provável libertação de toxinas parasitárias. FARIA [6], após relatar as alterações vasculares pulmonares em 8 casos típicos de *cor pulmonale* crônico esquistossomótico, não encontrou elementos para responsabilizar os ovos de *S. mansoni*, diretamente, pela patogênese das lesões de endarterite pulmonar, mostrando-se de acôrdo com a hipótese de JAFFÉ, que sustentava o mecanismo alérgico das lesões vasculares. Segundo ainda FARIA [6], as lesões de endarterite pulmonar não seriam produzidas diretamente pelos ovos e, sim, causadas por substâncias por êles libertadas, as quais determinariam uma reação ao nível do endotélio das pequenas artérias, arteríolas e pré-capilares, produzindo a êstes níveis um aumento da permeabilidade vascular.

MARCHAND & col.[15] interpretaram também o desenvolvimento da arteriolite obliterante

Trabalho realizado no Dep. de Anat. Patol. do Hosp. das Clínicas, Salvador, Bahia.

(1) Assistente de Anat. Patol. da Fac. de Med. da Univ. da Paraíba. Bolsista da CAPES, estagiando no Dep. de Anat. Patol. do Hosp. das Clínicas, Salvador, Bahia.

CHAVES, E. — *Cor pulmonale* **crônico esquistossomótico. II. Alguns aspectos das lesões vasculares pulmonares causadas pelos ovos de** *S. mansoni*. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 2:163-170.**

difusa como resultado de uma hipersensibilidade tissular, determinada pelas embolizações de ovos em arteríolas pulmonares e resultantes de possíveis reinfecções.

Em sucessivos trabalhos, FARIA [5, 6, 7] descreveu e caracterizou um novo tipo de lesão vascular causada pelos ovos de *S. mansoni*: — as fístulas arteriovenosas, diferentes das descritas em pulmão normal por PRINZMETAL & col.[19], TOBIN & ZARIQUIEY [23] e TOBIN [22] e resultantes da passagem do ovo do segmento arterial ao venoso, mediante a ação necrosante do mesmo sôbre a parede vascular. Segundo FARIA, já citado, estas fístulas de natureza esquistossomótica representariam uma possível via, através da qual os ovos ganhariam a circulação sistêmica [7], podendo representar o principal fator na gênese da marcada cianose que eventualmente aparece em portadores de esquistossomose pulmonar [9]. Êste autor e seus colaboradores [8] evidenciaram a importância clínica destas fístulas, estudando mais dois casos de esquistossomose pulmonar, descrevendo uma nova síndrome cianótica, caracterizada sobretudo por hepatosplenomegalia, cianose severa, hipertensão pulmonar discreta ou ausente, além de quadro angiocardiográfico característico.

ZAKY & col.[26], estudando cinco casos de *cor pulmonale* crônico esquistossomótico do ponto de vista clínico, verificaram através da cateterização cardíaca que a saturação de oxigênio aumentava em grau significante, quando o catéter avançava ao longo da artéria pulmonar dilatada, desde seu tronco, até as porções mais periféricas. Concluíram pela existência de uma intercomunicação da esquerda para a direita, através da rêde vascular das artérias broncopulmonares. Admitiram também que o local da anastomose deveria verificar-se ao nível da formação angiomatóide com as artérias broncopulmonares. Estas observações, contudo, não foram confirmadas morfològicamente.

Com a presente comunicação damos seqüência ao nosso estudo sôbre os principais aspectos anátomo-patológicos das lesões vasculares pulmonares, em 6 casos de *cor pulmonale* crônico esquistossomótico, autopsiados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas de Salvador, Bahia. Em relato anterior comentamos as lesões vasculares hipertensivas pulmonares e que cursaram na independência da ação direta de ovos ou vermes adultos de *S. mansoni*. Estudaremos agora alguns aspectos das lesões vasculares pulmonares causadas pelos ovos dêste parasita, sobretudo aquelas relacionadas às fístulas arteriovenosas e às lesões necrosantes arteriolares circunscritas por uma alveolite eosinofílica.

RESULTADOS

Os granulomas esquistossomóticos mais freqüentemente observados se localizavam sobretudo em arteríolas (fig. 1), pré-capilares e pequenas artérias musculares pulmonares. As reações granulomatosas podiam ser surpreendidas em vários períodos etários, desde as reações mínimas até as fases resolutivas finais, com formação de nódulo ci-

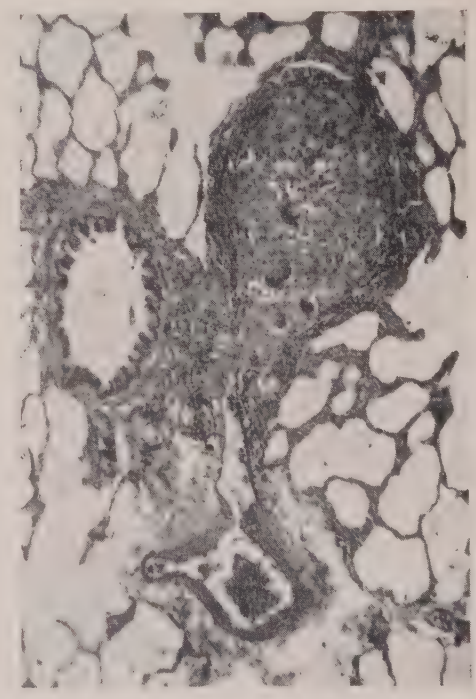


Fig. 1 — Reação granulomatosa esquistossomótica localizada em uma arteríola proveniente da artéria situada em baixo. (HE ×56,7)

catricial. Dentre estas, chamava a atenção uma reação necrosante vascular, centrada geralmente por um ou mais ovos de *S. mansoni*, conservando miracídio íntegro e comprometendo geralmente em sua periferia o revestimento endotelial vascular, o qual se apresentava tumefeito, com limites celulares indistintos, citoplasma granuloso e núcleos em diferentes etapas regressivas. A área necrótica central era formada de uma massa acidófila, no seio da qual observava-se grande quantidade de restos celulares, inclusive material pulverulento basófilo, parecendo representar fragmentos nucleares de cromati-

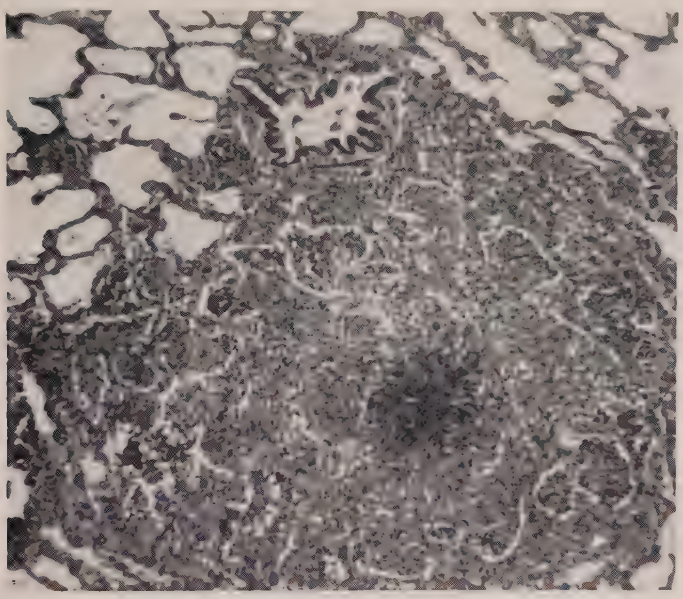


Fig. 2 — Reação vascular necrosante causada por ôvo de S. mansoni. *Observar uma alveolite circunscrita na qual predominam os eosinófilos. (HE ×56,7)*

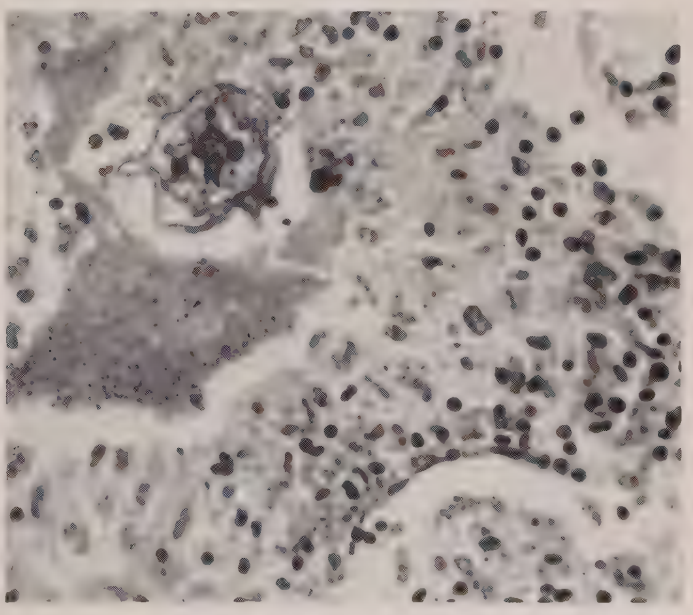


Fig. 3 — Reação esquistossomótica endovascular. Notar a grande mobilização de elementos mesenquimais, constituída sobretudo por células epitelióides (Hematoxilina fosfotúngstica ×360)

na, bem como um material de aspecto fibrinóide, periovular. A necrose podia ser vista atingindo todo o revestimento endotelial, além de destruir a membrana elástica interna e eventualmente porções segmentares da média das artérias musculares. Raramente a reação necrótica periovular era envolvida por uma alveolite circunscrita, na qual predominavam os eosinófilos e menos freqüentemente os neutrófilos (fig. 2). Algumas vêzes observa-se uma grande mobilização de células mesenquimais em tôrno do ôvo, sendo o infiltrado mais precocemente observado, constituído por linfócitos, monócitos e células epitelióides (fig. 3).

Muitos ovos de *S. mansoni* eram vistos penetrando no interior de colaterais ampliadas (figs. 4 e 5), algumas determinando intensas reações necróticas com destruição das paredes vasculares. Em outras secções via-se, geralmente na porção distal da colateral ampliada, granulomas em diversas fases evolutivas. Muitos dêstes mostram-se em canalização (fig. 6) e em outros vê-se uma proliferação de denso tecido de granulação, o qual estabelece, através dos vasos neo-for-

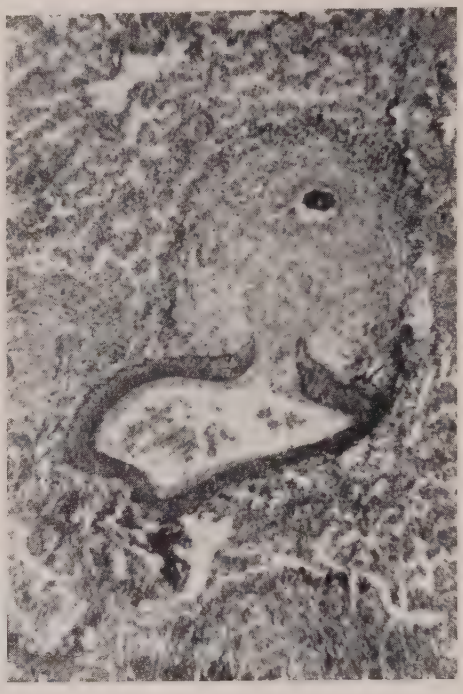


Fig. 4 — Reação granulomatosa esquistossomótica no interior de uma colateral ampliada (Weigert-Van Gieson, ×144).

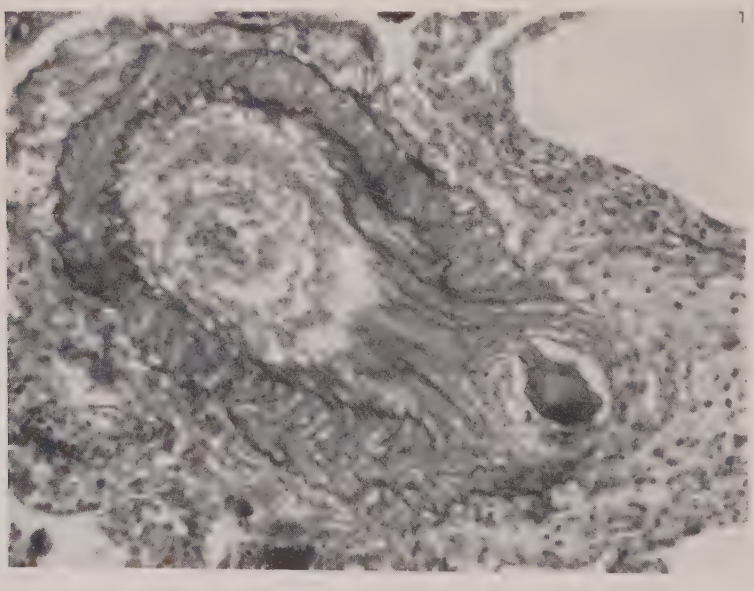


Fig. 5 — Secção transversal de uma artéria muscular exibindo marcada hipertrofia da média. Observar a passagem de um ôvo de S. mansoni *através de uma colateral neo-formada, bem como o espessamento fibro-acelular, localizado, da íntima (Weigert-Van Gieson, ×360).*

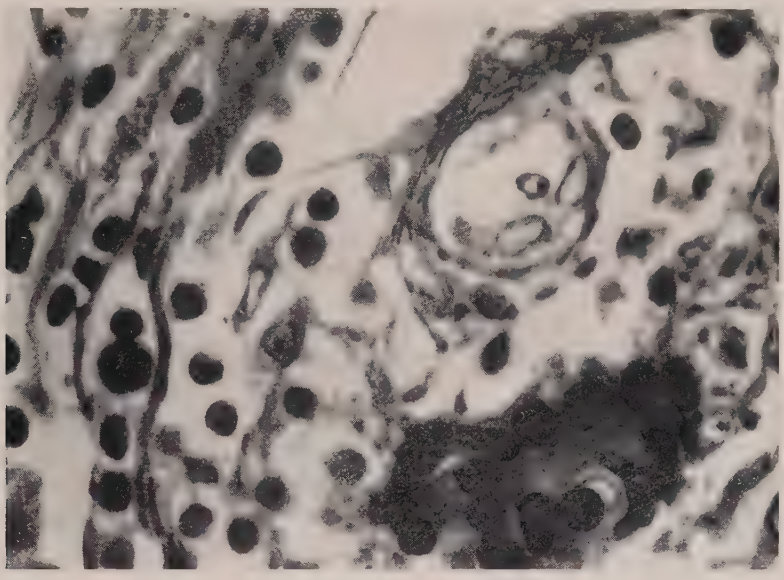


Fig. 6 — Granuloma esquistossomótico, mostrando, em seu centro, neoformação vascular. Abaixo, uma célula gigante contendo restos da casca quitinosa do ôvo.

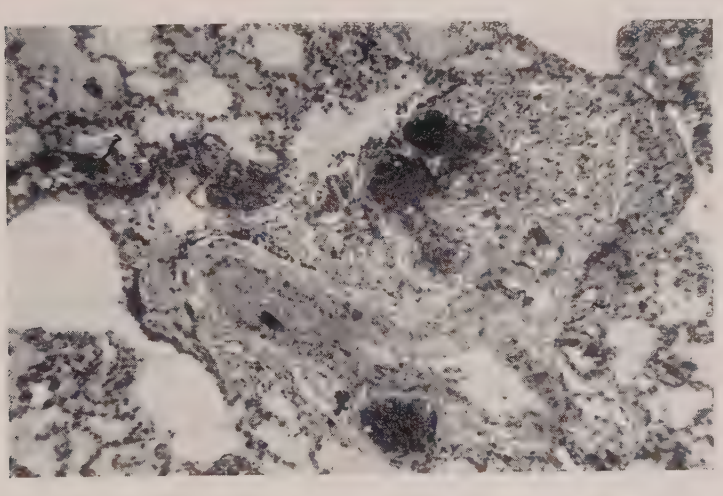


Fig. 7 — Formação de fístula arteriovenosa pré-capilar, às custas de brotos vasculares da reação esquistossomótica, os quais estabelecem a continuidade entre a colateral dilatada (pré-capilar), em cima, e os segmentos venosos das vizinhanças, à esquerda (HE ×144).

mados, comunicações com segmentos venosos da adventícia das artérias musculares ou das vizinhanças, constituindo fístulas arteriovenosas (fig. 7). Em outras secções foram surpreendidos, no interior de segmentos venosos dilatados, ovos de *S. mansoni*, conservando-se, em geral, estruturalmente íntegros (fig. 8).

A reação granulomatosa típica era formada de uma porção central, contendo uma ou mais células gigantes, englobando restos de casca quitinosa de ovos de *S. mansoni*,

envolvida perifèricamente por um infiltrado linfo-histiocitário, fibroblastos e fibras colágenas concêntricas e com tendência a um adensamento nas porções mais periféricas, delimitantes do granuloma; eventualmente, em tôrno da reação granulomatosa esquistossomótica, observava-se uma alveolite circunscrita, na qual predominavam os eosinófilos, fibrina e em menor quantidade os neutrófilos.

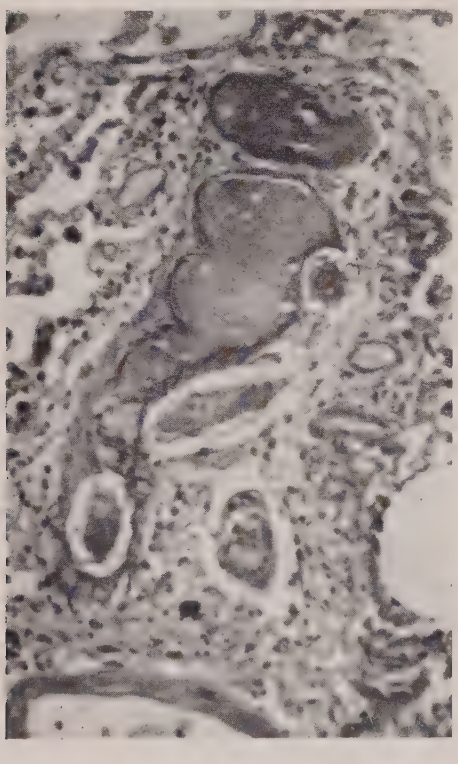


Fig. 8 — Segmentos venosos dilatados, contendo, em seu interior, ovos de S. mansoni *(HE ×360).*

COMENTÁRIOS

As lesões vasculares pulmonares, observadas em nossos 6 casos de *cor pulmonale* crônico esquistossomótico e dependentes da ação direta de ovos de *S. mansoni* e seus produtos, foram vistas em diferentes etapas evolutivas e de resolução, de acôrdo com a fase em que era surpreendida a reação granulomatosa esquistossomótica. Em casos em que havia indícios de reinfestações, a arterite, a arteriolite e a pré-capilarite necrosantes constituíram as lesões vasculares mais freqüentemente observadas. Elas são provàvelmente a expressão de uma reação de hipersensibilidade específica, frente a toxinas elaboradas pelo miracídio, o qual sempre foi demonstrado em nosso material, na porção central da área necrótica e geralmente conservando-se estruturalmente íntegro. Em fases outras, ainda recentes, quando o miracídio apresentara os primeiros sinais de modificações morfológicas, a mobilização precoce de elementos mesenquimais, com tendência a uma disposição granulomatosa, foi uma imagem histológica muito habitual. O aspecto da lesão vascular necrosante, a mobilização precoce de elementos mesenquimais, com ou sem formação de células gigantes, apesar de não patognomônicos, são altamente sugestivos de um estado de hipersensibilidade. O encontro de uma alveolite circunscrita eosinofílica, envolvendo sobretudo uma reação predominantemente necrosante de natureza esquistossomótica, reforça ainda mais a possibilidade da existência de um complexo mecanismo alérgico parasitário.

A cura do processo inflamatório da reação granulomatosa esquistossomótica leva a um espessamento da íntima, com marcada redução do lume dos pequenos vasos pulmonares [21]. A endarterite semi-obliterante resultante, quando suficientemente difusa, pode determinar um aumento lento e progressivo da resistência vascular pulmonar, dando origem a lesões vasculares hipertensivas [3], que posteriormente adquirem individualidade própria, levando ao quadro do *cor pulmonale* crônico esquistossomótico.

O encontro de fístulas arteriovenosas, em nosso material, veio confirmar as observações iniciais de Faria [5, 6, 7], a quem coube pela primeira vez descrevê-las e caracterizá-las histològicamente. Segundo êle, o *shunt* ou fístula arteriovenosa seria formada após a necrose determinada pelo ôvo sôbre as paredes vasculares arteriais e venosas adjacentes [5, 6, 7], comunicação esta que não se faz diretamente, mas, sim, através de novos capilares formados no tecido de granulação da área necrótica. Ainda Faria [8] admite uma segunda possibilidade de mecanismo de formação das referidas fístulas, através da organização de granulomas para-arteriais, sem haver necrose das veias adjacentes.

Nós observamos a formação de fístulas arteriovenosas a partir de tecido de granulação da reação esquistossomótica intra-arterial, sucedendo geralmente à necrose da parede dêste vaso, determinada pelos ovos de *S. mansoni*.

Chamamos a atenção, sobretudo, para a localização das referidas fístulas, a partir do tecido de granulação da reação esquistossomótica, localizada no interior de colaterais ampliadas. Êstes últimos vasos representam uma tradução do aumento lento e progressivo da pressão na pequena circulação [3] e assumem considerável importância para diminuir a tensão intravascular, em casos de *cor pulmonale* crônico esquistossomótico. Geralmente estas colaterais mostram-se de paredes finas, favorecendo a ação necrosante do ôvo e a posterior comunicação dos neovasos oriundos do tecido de granulação da reação esquistossomótica, com segmentos venosos das vizinhanças.

As fístulas arteriovenosas de natureza esquistossomótica representam a principal via de disseminação embólica de ovos de *S. mansoni* para a circulação geral [7]. Acreditamos que a condição hipertensiva pulmonar associada possa contribuir decisivamente para a disseminação embólica sistêmica de ovos de *S. mansoni*, ampliando fístulas arteriovenosas normais pré-existentes, sugeridas por HAYEK [12] e confirmadas posteriormente por PRINZMETAL & col.[19], TOBIN & ZARIQUIEY [23] e TOBIN [22], ou através da formação de *shunts* arteriovenosos, originados entre a porção distal dilatada da colateral neo-formada e segmentos venosos das vizinhanças [3].

SUMMARY

Chronic "cor pulmonale" in schistosomiasis. II. Some aspects of vascular lesions in lungs caused by "S. mansoni" eggs.

The Author studies a few aspects of the pulmonary vascular lesions caused by ova of the *S. mansoni* in 6 cases of chronic schistosomotic *cor pulmonale* whose post mortem was performed at the Department of Pathologic Anatomy of the "Hospital das Clínicas" in Salvador, Bahia.

The necrotizing vascular reactions are identified among the most outstanding alterations and are related to probable specific hypersensitivity phenomena as regards toxins elaborated by the miracidia.

A very characteristic tissular reaction is described, which the Author names eosinophilic circumscribed alveolitis, as a rule to be observed around some necrotizing vascular lesions of schistosomotic nature.

The existence of schistosomotic arteriovenous fistulae is confirmed; a new mechanism for their occurrence is described, that is, through the granulation tissue of the intra-arterial schistosomotic reaction which appears as a rule after the necrosis of the vascular walls, due to ova of the *S. mansoni*.

REFERÊNCIAS

1. BARROS, O. M. de; GIANNONI, F. G.; MARIGO, C. & FRIZZO, F. J. — "Cor pulmonale" e miocardite esquistossomóticos: considerações clínico-patológicas a propósito de dois casos. Arq. Hosp. Santa Casa São Paulo 2:2-40, 1956.

2. BEDFORD, D. E.; AIDAROS, S. M. & GIRGIS, B. — Bilharzial heart disease in Egypt; cor pulmonale due to bilharzial pulmonary endarteritis. Brit. Heart J. 8:87-95, 1946.

3. CHAVES, E. — Cor pulmonale esquistossomótico. I. Estudo das lesões vasculares associadas à hipertensão pulmonar. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 2:78-89, 1960.

4. DÍAZ-RIVERA, R. S.; RAMOS-MORALES, F.; SOTOMAYOR, Z. R.; LICHTEMBERG, L.; GARCÍA-PALMIERI, M. R.; CINTRÓN-RIVERA, A. A. & MARCHAND, E. J. — The pathogenesis of Manson's schistosomiasis. Ann. int. Med. 47:1082-1107, 1957.

5. FARIA, J. L. de — Cor pulmonale in Manson's schistosomiasis. I. Frequency in necropsy material; pulmonary vascular changes caused by schistosome ova. Amer. J. Path. 30:167-193, 1954.

6. FARIA, J. L. de — Histopatologia da endarterite pulmonar esquistossomótica (S. mansoni). Tese Fac. Med. Univ. Minas Gerais. São Paulo, 1952.

7. FARIA, J. L. de — Pulmonary arterio-venous fistulas and arterial distribution of ova of *Schistosoma mansoni*. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 5:860-862, 1956.

8. FARIA, J. L. de; BARBAS, J. V.; FUJIOKA, T.; LION, M. F.; ANDRADE e SILVA, U. de & DÉCOURT, L. V. — Pulmonary schistosomatic arteriovenous fistulas producing a new cyanotic syndrome in Manson's schistosomiasis. Amer. Heart J. **58**:556-567, 1959.

9. FARIA, J. L. de; CZAPSKI, J.; LEITE, M. O. R.; PENNA, D. de O.; FUJIOKA, T. & CINTRA, A. N. de U. — Cyanosis in Manson's schistosomiasis. Role of pulmonary schistosomatic arteriovenous fistulas. Amer. Heart J. **54**:196-204, 1957.

10. FARID, Z.; GREER, J. W.; ISHAK, K. G.; EL-NAGAH, A. M. & LEGOLVEN, P. C. — Chronic pulmonary schistosomiasis. Amer. Rev. Tuberc. & pulm. Dis. **79**:119-133, 1959.

11. GIRGIS, B.; GUIRGUIS, S.; MOWAFY, R. & EL-KATIB, H. — Bilharzial cor pulmonale. Amer. Heart J. **45**:190-200, 1953.

12. HAYEK, H. von — Die menschliche Lunge und ihre Gefässe, ihr Bau unter besonderer Berücksichtigung der Funktion. "Ergebn. Anat. & Entwicklungsgesch." **34**:144-249, 1952.

13. JAFFE, R. — Comunicaciones sobre la bilharziosis pulmonar. Gac. méd. Caracas **46**: 390-393, 1939.

14. KENAWY, M. R. — The syndrome of cardiopulmonary schistosomiasis (cor pulmonale). Amer. Heart J. **39**:678-696, 1950.

15. MARCHAND, E. J.; MARCIAL-ROJAS, R. A.; RODRÍGUEZ, R.; POLANCO, G. & DÍAZ-RIVERA, R. S. — The pulmonary obstruction syndrome in schistosoma mansoni pulmonary endarteritis. Report of five cases. Arch. int. Med. **100**:965-980, 1957.

16. MEIRA, J. A.; BEHMER, O. A. & BLOISE, W. — Endarterite pulmonar esquistosomótica: a propósito de um caso com comprovação necroscópica. Rev. Med. & Cir. São Paulo **11**:169-178, 1951.

17. MEIRA, J. A.; ELEJALDE, G. & PONTES, J. F. — Sôbre a arterite pulmonar esquistosomótica (revisão da literatura e apresentação de três casos, dos quais um comprovado pela necropsia). Arq. Fac. Hig. & Saúde públ. Univ. São Paulo **3**:325-428, 1949.

18. PRADO, A. de A. — Aspectos anátomo-clínicos da esquistossomose cardiopulmonar. Arterite pulmonar e síndromo de cardiaco negro. Arq. brasil. Cardiol. **3**:367-380, 1950.

19. PRINZMETAL, M.; ORNITZ Jr., E. M.; SIMKIN, B. & BERGMAN, H. C. — Arteriovenous anastomoses in liver, spleen, and lungs. Amer. J. Physiol. **152**:48-52, 1948.

20. SAMI, A. A. — Pulmonary manifestations of schistosomiasis. Dis. Chest **19**:698-705, 1951.

21. SHAW, A. F. B. & GHAREEB, A. A. — Pathogenesis of the pulmonary schistosomiasis in Egypt with special reference to Ayerza's disease. J. Path. & Bact. **46**:401-424, 1938.

22. TOBIN, C. E. — The bronchial arteries and their connections with other vessels in the human lung. Surg., Gynec. & Obst. **95**:741-750, 1952.

23. TOBIN, C. E. & ZARIQUIEY, M. O. — Arteriovenous shunts in the human lung. Proc. Soc. exper. Biol. & Med. **75**:827-829, 1950.

24. WILLIAMS, W. — Cor pulmonale in schistosomiasis. East Afr. med. J. **35**:1-5, 1958.

25. ZAKY, H. A. — Aneurysm of the pulmonary artery due to schistosomiasis. Dis. Chest **21**:194-204, 1952.

26. ZAKY, H. A.; HENEIDY, A.; TAWFICK, I. M.; GEMEI, Y. & KHADR, A. A. — Bronchopulmonary shunts in schistosoma cor pulmonale. Dis. Chest **36**:164-172, 1959.

Recebido para publicação em 18 janeiro 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(3):171-176, maio-junho 1960

A REAÇÃO INTRADÉRMICA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

I — Ensaios comparativos com antígenos de cercária, verme adulto, ôvo e miracídio

J. Pellegrino e J. M. Pompeu Memoria

RESUMO

Foi feito um estudo comparativo da reação intradérmica praticada com antígenos de cercária, verme adulto, ôvo e miracídio de *S. mansoni* em pacientes infectados com êste helminto. Quando os antígenos de cercária e verme adulto são empregados em concentrações equivalentes, em relação ao pêso do material dessecado, resultados comparáveis são obtidos. Os antígenos de ôvo e miracídio produzem reações menos intensas. Entretanto, as observações de Oliver-Gonzalez e colaboradores de que a reação intradérmica seria negativa em pacientes com esquistossomose ativa, não foram confirmadas.

Do ponto de vista prático, antígenos preparados com esquistossomos adultos devem ser preferidos para o diagnóstico da esquistossomose pela reação intradérmica, uma vez que a obtenção do material básico é relativamente fácil e o rendimento altamente satisfatório.

INTRODUÇÃO

Antígenos preparados com cercárias e esquistossomos adultos de *S. mansoni* têm sido amplamente utilizados para o diagnóstico da esquistossomose pela reação intradérmica (Pellegrino [4]) e investigações recentes sugerem que o teste cutâneo, praticado com antígeno de ôvo (Oliver-Gonzalez & col.[1, 2]) e de miracídio (Sherif [10]), pode ser utilizado como critério de cura desta helmintose. Entretanto, um estudo comparativo da atividade dêstes diferentes antígenos em pacientes com esquistossomose mansoni não foi ainda realizado. No presente trabalho serão relatadas observações a êste respeito.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes com esquistossomose. Os seguintes grupos de pacientes com exame de fezes positivo para ovos de *S. mansoni* foram utilizados no presente trabalho:

Grupo A — 50 adultos do sexo masculino, com 20 a 35 anos de idade. Os pacientes dêste grupo foram submetidos a testes intradérmicos, na mesma ocasião, com antígenos de cercária e verme adulto nas diluições de 1:1.000, 1:10.000 e 1:100.000.

Grupo B — 40 pacientes do sexo masculino, com 16 a 18 anos de idade. Neste grupo foram utilizados antígenos de cercária e de verme adulto, diluídos a 1:1.000.

Grupo C — 16 pacientes do sexo masculino, com 20 a 35 anos de idade. Neste grupo foram comparados os seguintes antígenos: cercária (1:1.000), verme adulto (1:1.000) e ambos antígenos misturados em partes iguais.

Inst. Nacional de Endemias Rurais, Centro de Pesquisas de Belo Horizonte e Inst. de Biologia, Faculdade de Filosofia da Universidade de Minas Gerais, Brasil.

Grupo D — 56 adultos do sexo masculino, com 20 a 40 anos de idade foram injetados por via intradérmica, na mesma ocasião, com antígenos de cercária, verme adulto e ôvo, diluídos a 1:2.000.

Grupo E — 33 adultos do sexo masculino, com 25 a 40 anos de idade, receberam intradèrmicamente, na mesma ocasião, antígenos de cercária, ôvo e miracídio, diluídos a 1:2.000.

Antígenos — O material básico para o preparo dos antígenos (cercárias, esquistossomos adultos, ovos e miracídios de *S. mansoni*) foi obtido de acôrdo com as técnicas descritas em trabalho anterior (PELLEGRINO [3]). Os antígenos foram preparados a partir do material dessecado, tendo sido utilizada solução de Coca mertiolatada a 1:5.000 como líquido extrator. A homogenização do material dessecado, prèviamente pesado e diluído a 1:1.000 (cercária e verme adulto) e 1:2.000 (ôvo e miracídio) em solução de Coca mertiolatada foi feita em aparelho "Virtis 45" (The Virtis Co., Yonkers, New York), durante 10 minutos em alta rotação, em banho de gêlo. A extração do material alergênico foi feita na geladeira (4° a 6°C) durante 24 horas. A suspensão assim obtida foi centrifugada a 3.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante usado como antígeno nos testes intradérmicos (PELLEGRINO & col.[9]). Tôdas as diluições dos antígenos foram feitas em solução de Coca mertiolatada.

Reação intradérmica — As reações intradérmicas foram feitas na parte média da face flexora dos antebraços, tendo-se injetado 0,05 ml de cada antígeno (nas diferentes diluições) com seringa BD de 0,25 ml munida de agulha adequada. Foi feita prévia casualização em relação aos antígenos e locais do antebraço. A leitura dos resultados foi feita após 15 minutos, usando-se como critério de interpretação a medida da área da pápula no decalque tomado em papel absorvente, ligeiramente umedecido, após delimitar com tinta o seu contôrno (PELLEGRINO & MACEDO [7]). Foram consideradas como positivas as reações com áreas de 1,2 cm^2 ou mais e como duvidosas aquelas com áreas de 1,0 e 1,1 cm^2.

Análise estatística — Constou a análise estatística do estudo da regressão das áreas das pápulas em relação aos logaritmos das concentrações dos antígenos (Grupo A) e da análise de variância para comparação dos antígenos em todos os grupos.

RESULTADOS

No Grupo A, a análise estatística revelou que a regressão linear explica totalmente a relação entre as áreas médias das pápulas e os logaritmos das concentrações dos antígenos de cercária e de verme adulto. A análise conjunta evidenciou que uma única reta explica a relação entre as áreas e as concentrações (fig. 1), sendo expressa pela equação $\hat{y} = 3{,}15 + 0{,}40\ x$. As áreas médias obtidas com os antígenos de cercária e de verme adulto (Grupo A) estão representadas no quadro I.

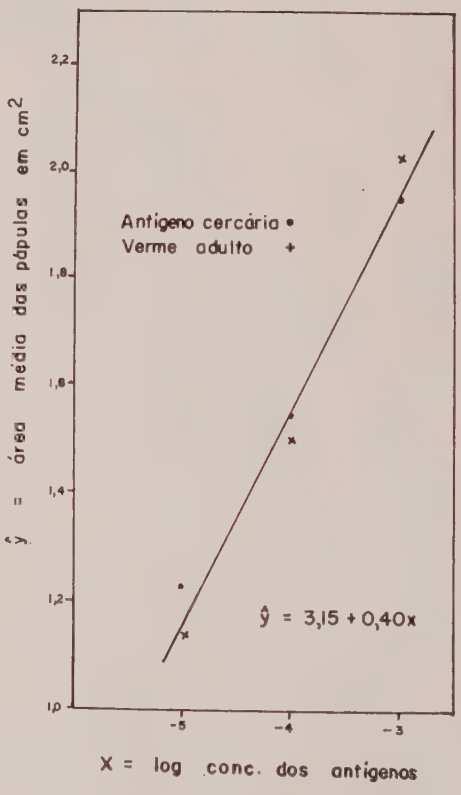


Fig. 1 — Regressão linear conjunta das áreas médias das pápulas em relação aos logaritmos das concentrações dos antígenos de cercária e verme adulto.

QUADRO I

Percentagens de reações positivas e áreas médias das pápulas (cm²) obtidas com antígenos de cercária e verme adulto, em diferentes concentrações (Grupo A).

Antígenos	*Concentrações dos antígenos*						*Êrro padrão da média*
	1:1.000		1:10.000		1:100.000		
	Área das pápulas (cm²)	*% de reações positivas*	*Área das pápulas* (cm²)	*% de reações positivas*	*Área das pápulas* (cm²)	*% de reações positivas*	
Cercária	1,94	*92*	1,54	*84*	1,23	*78*	± 0,04
Verme adulto	2,02	*92*	1,50	*84*	1,14	*54*	± 0,05

No Grupo B, a análise estatística mostrou que a diferença entre as áreas médias (1,51 ± 0,06 cm² para o antígeno de cercária e 1,64 ± 0,06 cm² para o antígeno de verme adulto) não foi significativa. Da mesma forma, quando os antígenos de cercária e verme adulto foram misturados em partes iguais (Grupo C) não houve diferença estatìsticamente significativa entre os resultados obtidos com esta mistura e com cada antígeno separadamente. As áreas médias obtidas foram de 2,19, 2,02 e 2,12 cm², respectivamente, para o antígeno de cercária, de verme adulto e para a mistura dêstes antígenos. O êrro padrão das médias foi de ±0,08.

Quando os antígenos de cercária, verme adulto e ôvo foram comparados entre si (Grupo D), êste último antígeno mostrou-se dotado de menor atividade. Assim, enquanto as áreas médias obtidas com os antígenos de cercária e verme adulto foram, respectivamente, de 1,87 e 1,74 cm², para o antígeno de ôvo, a área média foi de apenas 1,50 cm². A análise estatística mostrou que a diferença entre a área média para o antígeno de ôvo, comparada com aquelas obtidas com os outros dois antígenos foi significativa ao nível de 1% de probabilidade. O êrro padrão das médias foi de ±0,08. As percentagens de reações positivas foram, respectivamente, de 87,5, 84,0 e 76,8 para os antígenos de cercária, verme adulto e ôvo. Os resultados obtidos com os antígenos de cercária e de verme adulto não diferiram estatìsticamente.

A comparação entre os antígenos de cercária, ôvo e miracídio mostrou que a diferença entre as médias foi estatìsticamente significativa ao nível de 0,1%. Entretanto não houve diferença estatìsticamente significativa entre os antígenos de ôvo e miracídio. As áreas médias obtidas foram as seguintes (Grupo E): 2,41 cm² (antígeno de cercária); 1,95 cm² (antígeno de ôvo) e 1,68 cm² (antígeno de miracídio). O êrro padrão das médias foi de ±0,13. As percentagens de reações positivas foram, respectivamente, de 91, 85 e 70 para os antígenos de cercária, ôvo e miracídio.

DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que os antígenos de cercária e de verme adulto, empregados em diluições eqüivalentes, proporcionam resultados comparáveis. Êste fato foi verificado nos Grupos A, B e C e confirma observações já referidas em trabalhos anteriores. Em um grupo de 454 crianças com 10 a 15 anos de idade, tomadas sem seleção em zona de endemia esquistossomótica, a reação intradérmica foi positiva em 262 casos com o antígeno de cercária e em 250 casos com o antígeno de verme adulto. Os resultados foram concordantes em 351 casos (77,3%). Em 14 meninos as reações foram positivas com o antígeno de cercária e negativas com o antígeno de verme adulto e em 11 casos ocorreu o contrário (Pellegrino, Brener & Silva [6]). Em

adultos, com os mesmos antígenos, a concordância dos resultados foi muito maior. De fato, a reação intradérmica, praticada com antígenos de cercária e verme adulto, proporcionou resultados concordantes em 523 casos (94,3%) de um grupo de 558 militares tomados sem seleção. Sòmente em 4 casos a reação foi positiva com o antígeno de cercária e negativa com o antígeno de verme adulto, o contrário ocorrendo em 2 casos apenas (PELLEGRINO & BRENER [5]). A correlação entre os resultados obtidos com antígenos de cercária e verme adulto em pacientes com esquistossomose mansoni ativa pode ser melhor apreciada nas figs. 2 e 3. Na fig. 2 estão representados os resultados obtidos em 350 meninos (10 a 15 anos) e, na fig. 3, os resultados observados em 260 adultos. O coeficiente de correlação (r) foi de +0,646 para as áreas observadas com os dois antígenos em crianças e de +0,753 para os adultos. Ambos valores foram estatìsticamente significativos ao nível de 0,1% de probabilidade (PELLEGRINO & col.[9]). No presente trabalho ficou também demonstrado que, quando se misturam os antígenos de cercária e verme adulto em partes iguais, os resultados obtidos são prà-

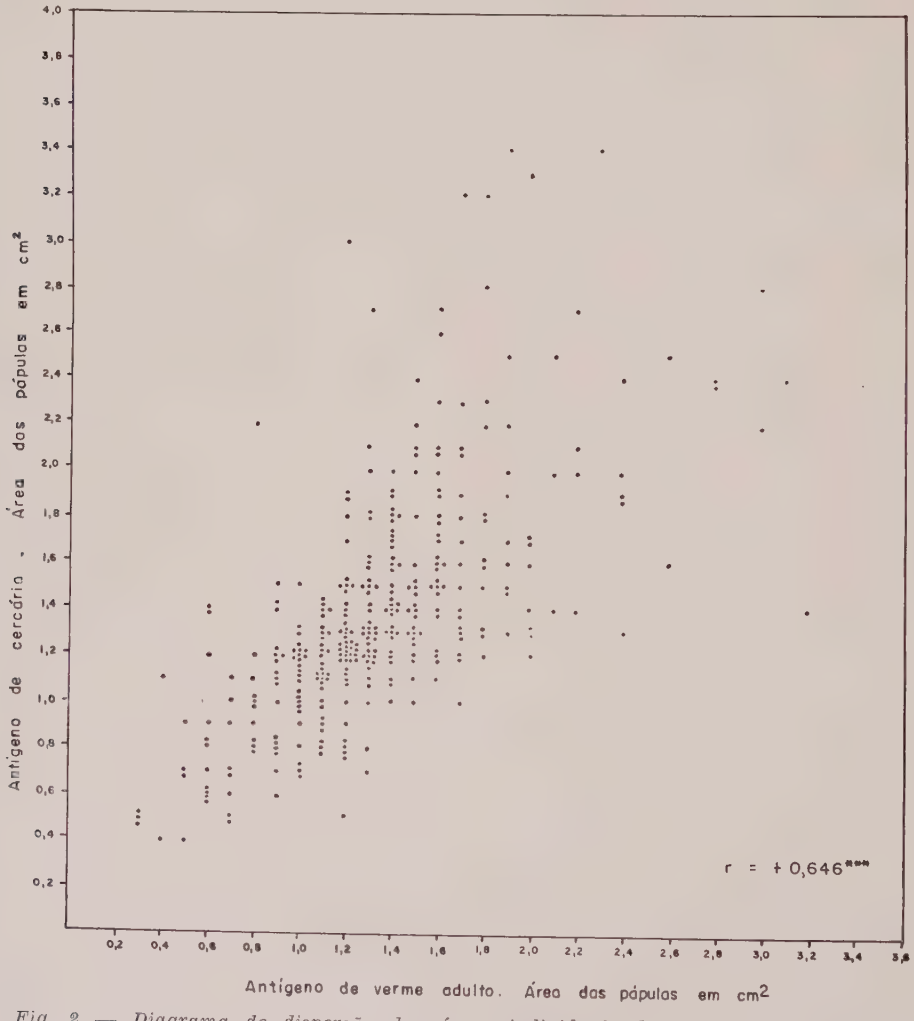


Fig. 2 — Diagrama de dispersão das áreas individuais das pápulas obtidas com antígeno de cercária e de verme adulto em 350 meninos (10 a 15 anos) com esquistossomose mansoni.

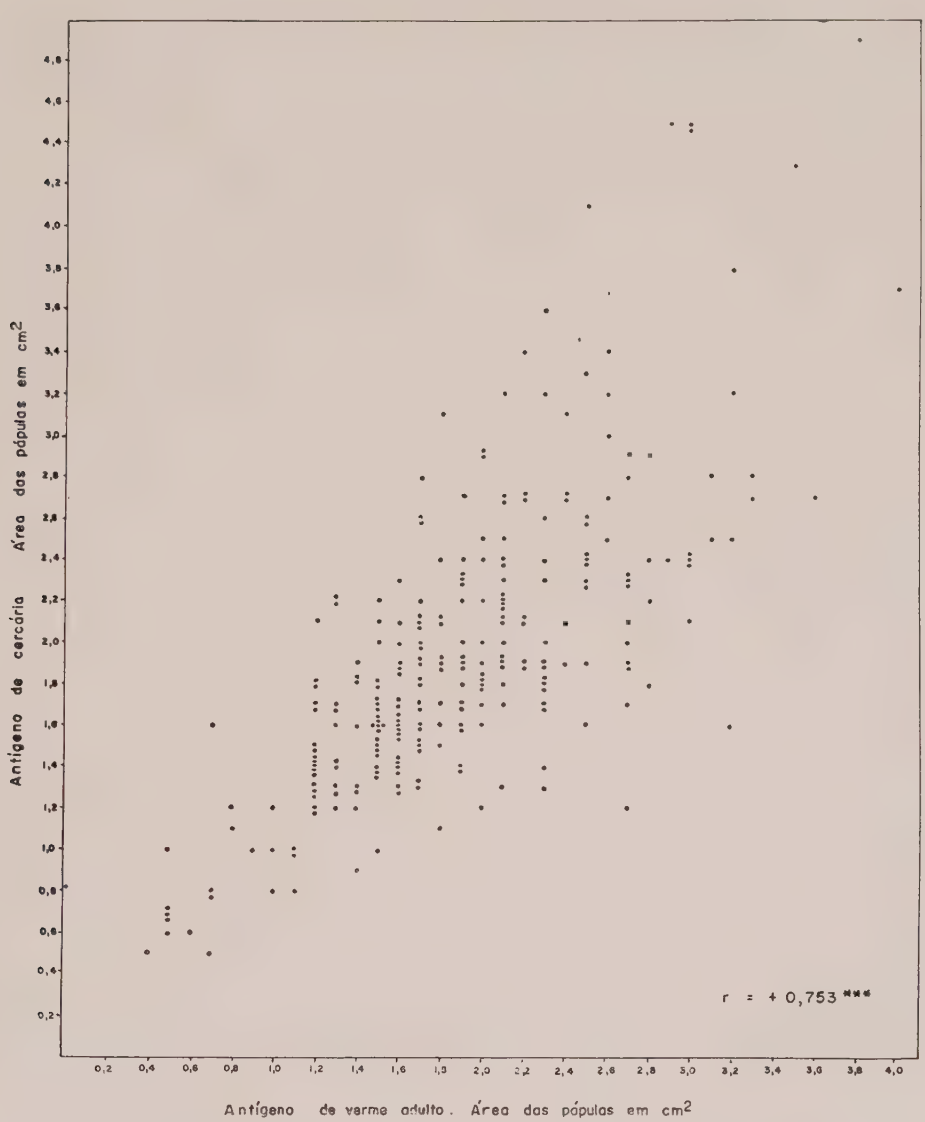


Fig. 3 — Diagrama de dispersão das áreas individuais das pápulas obtidas com antígeno de cercária e de verme adulto em 260 adultos, do sexo masculino, com esquistossomose mansoni.

ticamente os mesmos. Portanto, do ponto de vista prático, a utilização de antígenos preparados com esquistossomos adultos apresenta vantagens, pois neste caso a obtenção de material básico é mais fácil e o rendimento altamente satisfatório.

Comparando-se os resultados obtidos nos Grupos A e B vê-se que as reações foram muito menos intensas no Grupo B (pacientes com 16 a 18 anos de idade) do que no Grupo A (pacientes com 20 a 35 anos). A influência da idade sôbre os resultados da reação intradérmica já foi referida em trabalho anterior (PELLEGRINO, MEMORIA & MACEDO [8]).

Os resultados das observações feitas nos Grupos D e E mostram que as reações obtidas com antígenos de ôvo e miracídio são menos intensas do que as observadas com antígenos de cercária e verme adulto. En-

tretanto, não confirmamos as observações de Oliver-Gonzalez & col.[1, 2] de que a reação intradérmica com antígeno de ôvo seria negativa em indivíduos infectados com *S. mansoni*. Embora a percentagem de reações positivas com antígeno de ôvo tenha sido menor do que a obtida com antígeno de cercária ou verme adulto (76,8% no Grupo D e 85% no Grupo E), é de se esperar que utilizando-se o antígeno de ôvo mais concentrado se obtenham resultados comparáveis àqueles verificados com antigenos de cercária e verme adulto.

SUMMARY

The intradermal test in the diagnosis of schistosomiasis mansoni. I — Comparison of cercarial, adult worm, egg and miracidial antigens.

A comparative study was made of the skin reactivity of patients infected with *S. mansoni* using antigens prepared from cercariae, adult worms, eggs and miracidia of the parasite. When employed in concentrations based upon equivalent dry weights of the test materials, cercarial and adult worm antigens gave similar results.

When egg and miracidial antigens were tested simultaneously in the same patients the observed reactions were weaker than those obtained with cercarial and adult worm antigens. Nevertheless, the observations of Oliver-Gonzalez *et al.* that patients with active *S. mansoni* infections gave negative skin reactions to egg antigen were not confirmed in this study.

Even though adult worm and cercarial antigens were equally active, the use of adult worm antigen is technically preferable because large quantities of adult schistosomes and good final yields of dried material are readily obtained.

REFERÊNCIAS

1. OLIVER-GONZALEZ, J.; BAUMAN, P. M. & BENNENSON, A. S. — Immunological aspects of infections with *Schistosoma mansoni*. Am. J. trop. Med. & Hyg., **4**:443-452, 1955.

2. OLIVER-GONZALEZ, J.; BAUMAN, P. M. & BENNENSON, A. S. — Intradermal response to egg antigen in human with active and treated (Fuadin) *Schistosoma mansoni* infections. Proc. Soc. exp. Biol. & Med., **87**: 186-188, 1954.

3. PELLEGRINO, J. — Diagnóstico das esquistossomoses pela reação itradérmica. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop., **9**:105-121, 1957.

4. PELLEGRINO, J. — The intradermal test in the diagnosis of bilharziasis. Bull. Wld. Health Org., **18**:945-961, 1958.

5. PELLEGRINO, J. & BRENER, Z. — Estudo comparativo entre a reação intradérmica e o exame de fezes no diagnóstico da esquistossomose mansoni. II — Observações feitas em adultos. Rev. brasil. Malariol. & Doenças Trop., **10**:297-302, 1958.

6. PELLEGRINO, J.; BRENER, Z. & SILVA, J. F. — Estudo comparativo entre a reação intradérmica e o exame de fezes no diagnóstico da esquistossomose mansoni. — Observações feitas em crianças residentes em foco de alta endemicidade. Rev. brasil. Malariol. & Doenças Trop., **10**:291-296, 1958.

7. PELLEGRINO, J. & MACEDO, D. G. — Novo critério de leitura da reação intradérmica na esquistossomose. Rev. brasil. Malariol. & Doenças Trop., **8**:499-509, 1956.

8. PELLEGRINO, J.; MEMORIA, J. M. P. & MACEDO, D. G. — Quantitative aspects of the intradermic test with cercarial antigen in schistosomiasis. J. Parasitol., **43**:304-307, 1957.

9. PELLEGRINO, J.; REZENDE, C. L.; MEMORIA, J. M. P.; MOURÃO, O. G. & BRENER, Z. — Diagnóstico de laboratório da esquistossomose mansoni na criança. J. Pediatria, Rio de Janeiro, **24**:212-230, 1959.

10. SHERIF, A. F. — A new intradermal antigen for the diagnosis of schistosomiasis. Ann. trop. Med. & Parasitol., **50**:105-112, 1956.

Recebido para publicação em 3 junho 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(3):177-182, maio-junho 1960

ALTERAÇÕES ELECTROCARDIOGRÁFICAS DETERMINADAS PELO GLUCONATO DE SÓDIO E ANTIMONILA, NO TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Paulo Nunes Meireles e Geraldo Rabelo Machado

RESUMO

Os autores estudaram electrocardiogràficamente as alterações produzidas pelo gluconato de sódio e antimonila em 21 pacientes portadores de esquistossomose mansônica, nos quais não haviam sinais clínicos, radiológicos ou electrocardiográficos de cardiopatias, exceto em um, que era portador de hipertensão arterial pulmonar esquistossomótica.

Electrocardiogramas foram registrados, antes do comêço da terapêutica específica, nos 3.º e 6.º dias de uso do medicamento e 2 dias após terminada a administração da substância em estudo. Posteriormente, sempre que o traçado se apresentasse diferente do primeiro, eram repetidos novos electrocardiogramas até o retôrno à situação inicial.

Em seguida, uma análise minuciosa dos traçados electrocardiográficos demonstrou que a freqüência cardíaca diminuiu sensìvelmente em 3 casos; a onda P aumentou de amplitude em 2 casos; o espaço PR aumentou em 8 casos e diminuiu em 3; houve diminuição de amplitude QRS em 2 casos, empastamento em 1 e alargamento em 3; o segmento ST apresentou desnível positivo convexo para cima com T negativo em 5 casos e com ondas T do tipo ± em 6; as ondas T negativaram-se em 17 casos e diminuíram de amplitude em 4; o intervalo QT aumentou em 15 casos e diminuiu em 9.

Uma completa observação da evolução electrocardiográfica, até a apresentação do padrão inicial foi possível em 13 casos, observando os autores que o prazo máximo desta normalização foi de 51 dias e o mínimo de 9 dias.

O trabalho finaliza concluindo que as alterações de ST e T foram mais freqüentes do que demonstraram outros autores que usaram o mesmo sal, e chamando a atenção para o problema de repetição do tratamento em paciente, ainda com anormalidades electrocardiográficas, produzidas no decurso do tratamento anterior.

INTRODUÇÃO

As alterações electrocardiográficas observadas no decurso do tratamento pelos antimoniais serviram de motivo para inúmeros estudos de ordem clínica e experimental, sendo emitidas várias hipóteses a respeito do mecanismo fisiopatológico destas alterações.

No presente trabalho, nos propomos mostrar as modificações electrocardiográficas produzidas pelo gluconato de sódio e antimonila (Triostib), usado sistemàticamente em nossos pacientes portadores de esquistossomose mansônica, que tiveram indicação para o tratamento específico.

Já são conhecidos idênticos resultados produzidos pela fuadina [1], tártaro emético [4], antiomalato de lítio [8], as tioxantonas [6] e mais

Fác. Medicina da Univ. Recife — Cad. de Doenças Trop. e Infectuosas (Prof. Ruy João Marques).

recentemente foram feitos estudos com o gluconato de sódio e antimonila [7].

De posse dêsses dados e da observação clínica, durante a terapêutica antimonial, vemos que são mais significativos os cuidados dispensados ao aparelho cardiovascular, que aos distúrbios da função hepática.

MATERIAL E MÉTODOS

O nosso trabalho consta do estudo de 21 pacientes, portadores de esquistossomose mansônica, não tratados anteriormente desta parasitose. Foi repetido o tratamento em 3 pacientes, elevendo-se assim para 24 o total de casos.

A distribuição por idade foi a seguinte:

11 a 20 anos	9 casos
21 a 30 anos	9 casos
31 a 40 anos	3 casos

As formas clínicas da esquistossomose estavam assim distribuídas:

a) Forma hepatosplênica	4 casos
b) Forma hepatosplênico-intestinal	8 casos
c) Forma intestinal	8 casos
d) Forma hepatosplênico-pulmonar	1 caso

Os exames clínicos, radiológicos e electrocardiográficos não demonstraram sinais de cardiopatia, exceto em um paciente que era portador de *cor pulmonale* esquistossomótico.

Foram registrados traçados electrocardiográficos, antes de iniciar o tratamento, no 3.° e 6.° dia dêste e 2 dias depois do término da terapêutica antimonial, repetindo-se quando necessário, a intervalos de tempo variáveis, até que o traçado ficasse igual ao primeiro.

Registraram-se as derivações *standard*, unipolares dos membros e precordiais de V_1 a V_6, sendo usada nestas últimas uma estandardização de 1 mv = 0,5 cm.

O sal usado foi o gluconato de sódio e antimonila (Triostib), o qual contém 67,5 mg de antimônio em cada ampôla de 0,225 g do sal.

Administrou-se por via endovenosa durante 6 dias, uma dose total de 20 mg por quilo de pêso, fracionada em 6 doses.

Durante o tratamento, o paciente era submetido a repouso no leito e uso endovenoso de glicose, vitamina C e vitamina B_1.

Três casos (5, 8 e 14) fizeram repetição do tratamento em intervalos de 44, 58 e 47 dias, respectivamente, a partir do término do primeiro tratamento.

Realizamos a análise da freqüência cardíaca, ondas P, QRS, ST, T e QT.

RESULTADOS

Todos os nossos casos apresentaram alterações electrocardiográficas no decurso do tratamento. Apenas um caso, que não consta desta casuística, acusou manifestações tóxicas que impediram a continuação do tratamento.

Em raros casos pudemos observar sintomas moderados de toxicidade, manifestados por mal-estar, astenia, febre, disenteria e presença de lesões vesiculosas, localizadas nas regiões interdigitais das mãos e em tôrno dos lábios.

A análise das alterações electrocardiográficas mostrou o seguinte:

a) *Freqüência cardíaca:*

Em apenas três casos houve significativa diminuição da freqüência cardíaca. Nos demais casos, as pequenas variações não tiveram significado.

b) *Ondas P:*

Em dois casos (4 e 11) pudemos observar aumento da amplitude de P, em derivações *standard*, sendo tal alteração reversível.

c) *Espaços PR:*

Em oito casos constatou-se alargamento dêsse espaço; em três houve encurtamento.

d) *Complexos QRS:*

Diminuição de amplitude em dois casos; empastamento em um; alargamento em quatro; encurtamento em três; extrassístoles ventriculares em um.

e) *Segmentos ST:*

Em cinco casos houve desnivelamento positivo convexo para cima, com T negativo.

Em seis casos, o segmento ST era positivo convexo para cima e se continuava com um T difásico (do tipo ±), de tal forma que tornava difícil saber os limites de ST com a parte positiva de T.

Estas alterações foram observadas em V_1, V_2, V_3, V_4. Nos treze casos restantes não houve alteração de ST.

f) *Ondas T:*

Em todos os nossos casos, pudemos observar alterações de T, as quais foram difusas.

Em dezessete casos houve negativação, mais freqüente em V_2, V_3 e V_4. Nos outros casos foi nítida a diminuição de amplitude.

g) *Intervalos QT:*

Houve aumento em quinze casos e diminuição em nove. As alterações de ST e T tiveram início no segundo dia em três casos; no terceiro dia em dez; no quarto dia em dois; no quinto dia em quatro e no sexto dia em quatro, havendo, portanto, uma incidência maior no terceiro dia.

Nos treze casos que pudemos acompanhar a evolução electrocardiográfica até o retôrno ao normal, verificamos que a regressão e a normalização se fizeram conforme o exposto no quadro seguinte:

Caso	*Início da regressão* (dia)	*Volta ao normal* (dia)
4	15º	45º
5	8º	18º
5 bis	...	19º
7	10º	36º
9	...	9º
11	...	10º
13	...	19º
14	...	15º
17	11º	...
18	12º	22º
19	16º	36º
20	13º	51º
21	7º	29º

Vê-se por aí que a normalização se fêz no prazo máximo de 51 dias e mínimo de 9 dias, a contar da data em que foi iniciado o tratamento.

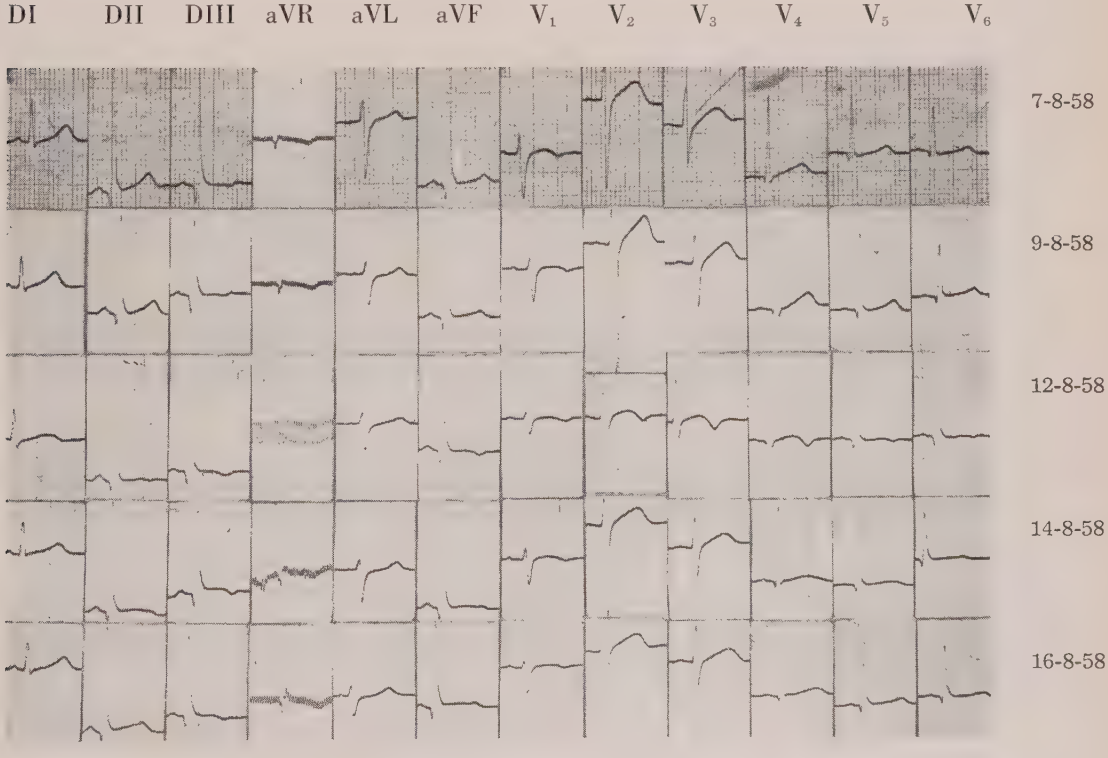


Fig. 1 — Caso 5

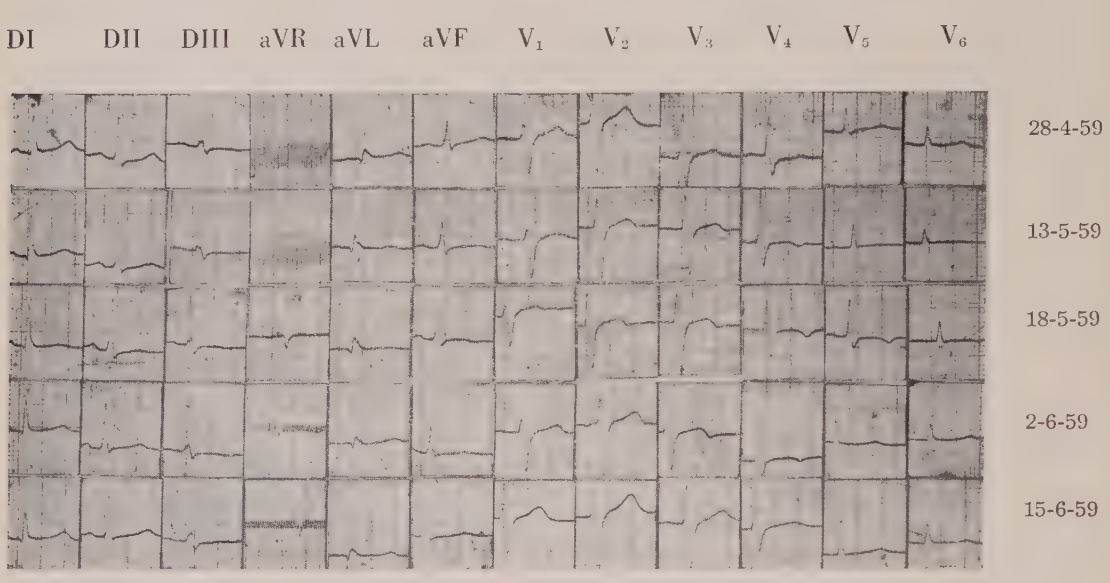


Fig. 2 — Caso 7

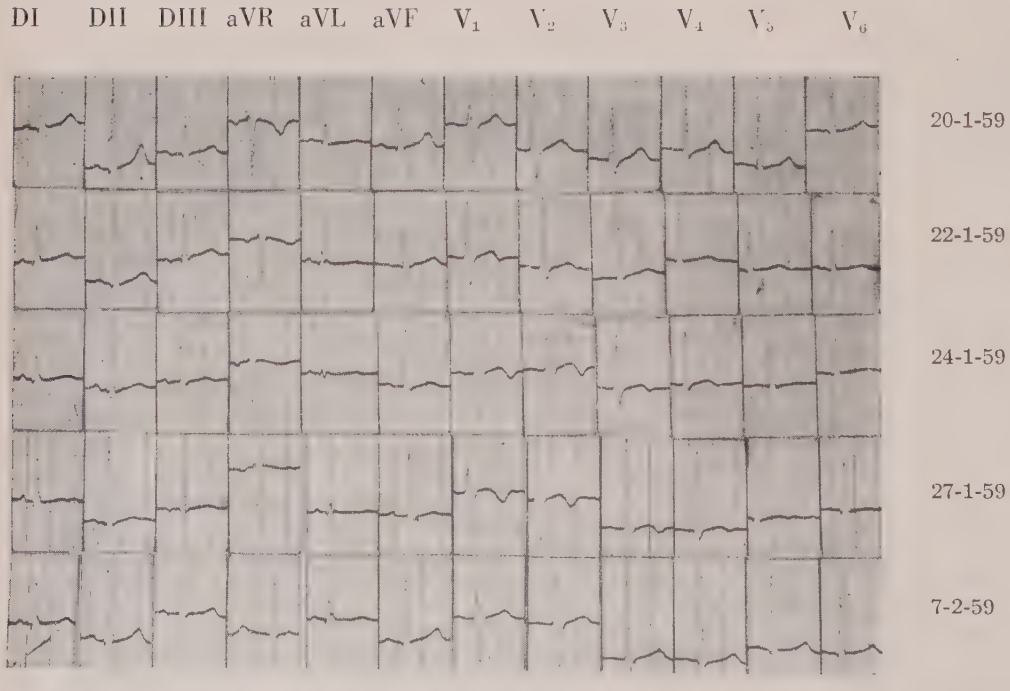


Fig. 3 — Caso 13

COMENTÁRIOS

Os nossos achados diferem um pouco dos de outros autores [5 e 6], que encontraram moderadas alterações de repolarização ventricular em seus pacientes, tratados pelo mesmo sal por nós usado.

Sob êste aspecto encontramos maior incidência de isquemia que o registrado por aquêles autores.

Não dispomos de elementos que nos permitam opinar sôbre a patogenia dêstes distúrbios, porém nos inclinamos mais pela hipótese de que êles dependem da "regeneração" de fibras musculares lesadas pelo antimônio [3].

Estas idéias diferem das de outros autores [2], que atribuem ditas alterações a uma vasodilatação capilar acentuada, a qual, diminuindo o fluxo sangüíneo coronário, resultaria em isquemia miocárdica. Pela duração da isquemia, que às vêzes é superior a cinqüenta dias após o tratamento, achamos pouco provável que durante todo êsse tempo persista a vasodilatação.

Torna-se importante, do ponto de vista prático, assegurar-se da duração destas alterações anátomo-patológicas, uma vez que em certos casos a repetição do medicamento se faz necessária e isto só poderá ser realizado quando tiver desaparecido o efeito do primeiro tratamento, o que poderá ser evidenciado pelo electrocardiograma.

SUMMARY

Electrocardiographic alterations determined by sodium antimonyl gluconate in the treatment of schistosomiasis mansoni.

The authors studied the electrocardiographic alterations produced by the sodium antimonyl gluconate in 21 patients who had schistosomiasis mansoni but hadn't any clinical, radiological or electrocardiographic signs of heart disease; only one had pulmonary arterial hypertension of bilharzial origin.

Electrocardiograms were taken before therapy was started; then, on the 3rd and the 6th day during the treatment and again, two days after the end of the same; later on, if the electrocardiograms showed any differences from the first, new graphs were taken until the return to normality.

A detailed analysis of the electrocardiograms showed that: a) the frequency of the heart diminished notably in 3 cases; b) the P-waves were amplified in 2 cases; c) the P-R interval increased in 8 cases and diminished in 3; d) the QRS, in two cases, decreased in amplitude, in one it became thick and, in three it became wider; e) the S-T segment presented upward positive convex displacement with a negative T-wave in 5 cases and with plus-minus type in six; f) the T-waves became negative in 17 cases and decreased in 4; g) the QT interval increased in 15 cases and diminished in 9.

A full observation (until the return to normality) of the graphic evolution was possible in 13 cases; the process of normalization varied between 9 and 51 days.

The authors stress that the S-T and T alterations were more frequent in their cases than among patients observed by some other investigators; they call attention to the problem concerning the repetition of the antimonial therapy in certain cases in which electrocardiographic abnormalities have been established since the first treatment.

REFERÊNCIAS

1. BEASER, S. B. & RODRIGUEZ-MOLINA, R. — Electrocardiographic changes occurring during treatment with Fuadin solution. Am. Heart J. 32:634-644, 1946.

2. DIAS, C. B. — Quimioterapia antimonial na esquistossomose mansoni. Tese Fac. Med. Univ. Minas Gerais. Salvador, 1949.

3. LEPESCHKIN, E. — Modern electrocardiography. Baltimore, Williams & Wilkins, 1951. Cap. 8, p. 292-459.

4. MEIRA, J. A. & RAMOS Jr., J. — Considerações sôbre o electrocardiograma na esquistosomíase mansoni. Hospital, Rio de Janeiro **26**:717-746, 1944.

5. PEDRIQUE, M. R. — Tratamiento de la bilharziosis con el gluconato de antimonio y sodio (Triostam). G.E.N. **12**(3):39-43, 1958.

6. PORTUGAL, O. P.; VILELA, M. P.; SOARES, M. A. & BOCANEGRA, J. — Estudos electrocardiográficos de pacientes esquistossomóticos tratados com antimoniais e tioxantinas. Congr. brasil. Cardiol., 15º, 1958, 2(3):190.

7. SILVA, J. R. da — Aspectos básicos relativos à terapêutica específica na esquistossomose mansoni. Rev. brasil. Malariol. **9**:417-435, 1957.

8. SUÁREZ, R. M.; SANTIAGO-STEVENSON, D. & HERNÁNDEZ-MORALES, F. — Electrocardiographic changes during anthiomaline treatment of schistosomiasis. Am. Heart J. **36**: 923-933, 1948.

Recebido para publicação em 2 de abril de 1960.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
2(3):183-188, maio-junho 1960

EPIDEMIOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE E VARIAÇÃO PERIÓDICA DAS POPULAÇÕES MALACOLÓGICAS, EM PERNAMBUCO, BRASIL

Mário Pinotti, Luís Rey, Mário B. Aragão e Antônio G. Cunha

RESUMO

Capturas sistemáticas e intensivas feitas por equipes de meninos pertencentes aos Pelotões de Saúde, em Pernambuco, permitiram obter conhecimentos importantes sôbre a variação das populações de moluscos (*Australorbis stramineus*) em Vitória de Santo Antão e outras cidades.

Em Vitória, registrou-se grande abundância de caramujos, ocorrendo anualmente (entre setembro e dezembro) com duração limitada a um, dois ou três meses. Os picos da curva de abundância se relacionam com o término das estações chuvosas incidindo no período de estiagem; mas em trechos diferentes do mesmo rio nota-se defasagem entre as respectivas curvas, que podem atingir 1 a 4 meses de diferença.

O volume d'água dos criadouros, suas características químicas, etc., além do comportamento próprio de cada colônia de moluscos devem ser investigados para interpretação adequada do fenômeno.

Com apoio em tais observações sugere-se o ensaio de métodos de combate aos moluscos em bases mais objetivas e de rigoroso contrôle.

INTRODUÇÃO

Há muito vem sendo constatada, por diferentes autores [1, 2, 3, 4, 6, 7], a variação que sofrem as populações de planorbídeos em seu habitat natural e, também, sua relação com o regime de chuvas.

Poucos, entretanto, têm atribuído importância ao fato e procurado tirar ilações para o conhecimento da epidemiologia da esquistossomose.

Pensamos que tal atitude diante do problema decorre de duas causas principais: (1.°) a falta de dados numéricos abundantes e de observações extensas no espaço e no tempo; (2.°) as dificuldades de uma interpretação exata do fenômeno ou, mesmo, sua interpretação incorreta, afastando qualquer possibilidade prática de utilização na luta contra a esquistossomose.

No entanto, a precariedade dos recursos atuais para um combate efetivo à endemia está a exigir pesquisas aprofundadas sôbre a biologia e a ecologia dos moluscos vetores. Os insucessos verificados na aplicação de molusquicidas, por exemplo, sugerem não só a necessidade de se encontrar novos compostos ativos, como de um conhecimento maior dos caramujos a destruir. A forma e o momento mais adequados para aplicação das drogas talvez venham a ser indicados por êsses estudos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os dados aqui apresentados resultam de um trabalho intensivo e sistematizado de captura de moluscos feito em cidades do Estado de Pernambuco com altos índices de

Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Endemias Rurais e Fac. de Med. da Univ. de São Paulo — Dep. Parasitologia.

prevalência da esquistossomose: Vitória de Santo Antão, 61,6%; Moreno, 66,5%; Ribeirão, 74%; Escada, 82%; Caruaru, 33,5% (entre escolares de 7 a 14 anos [5]).

As observações principais referem-se a Vitória de Santo Antão, onde as pesquisas vêm sendo mantidas desde o início de 1955, ao passo que nas demais cidades se restringem ao período de janeiro de 1955 a setembro de 1956.

A transmissão da helmintose, em Vitória, tem lugar ao longo das margens do rio Tapacurá que, procedendo da escarpa oriental do planalto da Borborema, é um rio de regime torrencial, correndo sôbre rochas cristalinas e indo desembocar no rio Capibaribe.

No percurso que faz dentro da cidade e seus arredores, o rio Tapacurá foi dividido em trechos com 200 metros de extensão, em cujas margens (cêrca de 400 metros) procedia-se à coleta e contagem da totalidade dos moluscos que se podia conseguir, trabalhando 2 horas por dia, 3 dias por semana.

Um efetivo de 50 meninos, com idade entre 10 e 15 anos, constitui o *Pelotão da Saúde* da cidade. Êles recebem instrução primária e educação sanitária em uma escola mantida pelo Serviço de Combate à Esquistossomose e, por outro lado, fazem o trabalho de captura em equipes de dois meninos por trecho, procedendo-se ao rodízio dos trechos atribuídos cada dia às equipes. O trabalho é remunerado, distribuindo-se a verba disponível em quotas proporcionais ao número de moluscos que mensalmente cada menino conseguiu apanhar. Os primeiros colocados recebem, além disso, uma gratificação. São êles assim estimulados para o máximo de rendimento e emulação.

Ao fim de cada jornada de trabalho, procede-se ao cálculo e anotação do número de moluscos conseguidos em cada um dos trechos do rio, sendo a contagem feita um a um, nas amostras pequenas (estimadas em menos de meio milhar), enquanto que nas maiores calcula-se o número pelo volume da amostra, medido em recipientes prèviamente calibrados e com capacidade para 1.000 conchas. Em virtude das diferenças de tamanho dos espécimes, admite-se um êrro inferior a $\pm 5\%$.

A espécie transmissora de esquistossomose mansônica em Vitória de Santo Antão é o *Australorbis stramineus* (= *Tropicorbis centimetralis*), não sendo aí encontradas outras espécies de planorbídeos.

RESULTADOS

Na figura 1 (e quadro I) registra-se a variação da população malacológica, em Vi-

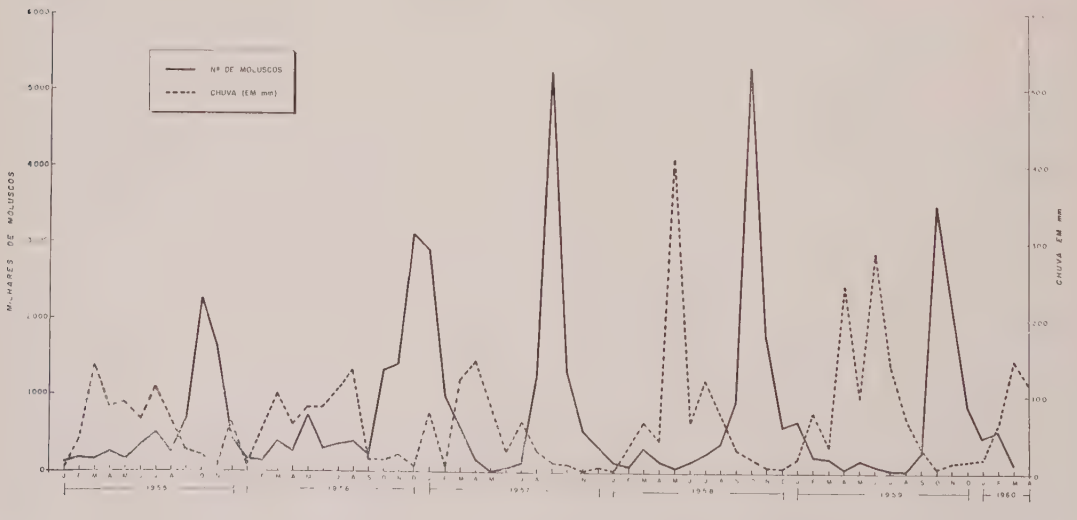


Fig. 1

tória de Santo Antão, no período compreendido entre janeiro de 1955 e abril de 1960. Nela se inscreve também o total mensal de chuvas caídas na região.

1.º) No trecho superior, compreendendo cêrca de 2 quilômetros de extensão e com habitações construídas a alguma distância das margens, observa-se uma curva com um

QUADRO I

Número de moluscos (*A. stramineus*) capturados ao longo do rio Tapacurá, na cidade de Vitória de Santo Antão, de janeiro de 1955 a abril de 1960.

Mês	*Ano*					
	1955	1956	1957	1958	1959	1960
Janeiro	119.562	166.320	1.893.014	132.476	673.950	474.700
Fevereiro	182.120	139.900	980.638	90.659	215.750	547.950
Março	158.807	388.340	563.511	321.528	181.750	122.261
Abril	256.416	273.465	159.210	146.510	65.400	233.762
Maio	161.908	732.590	6.748	68.173	172.400	...
Junho	352.087	295.500	50.643	144.200	103.950	...
Julho	509.097	361.900	122.057	650.377	44.200	...
Agôsto	254.380	391.100	1.228.096	381.759	33.971	...
Setembro	685.374	211.030	5.229.150	937.700	277.004	...
Outubro	2.259.168	1.317.800	1.308.978	5.287.750	3.493.780	...
Novembro	1.644.286	1.395.200	543.125	1.759.150	2.076.500	...
Dezembro	427.050	3.096.200	344.233	595.150	886.500	...

Dois fatos se destacam muito claramente: primeiro, a existência, em cada ano, de um curto período de grande abundância de caramujos, estendendo-se por um a três meses e separado por longos intervalos com capturas pouco produtivas.

Segundo, a coincidência dos picos anuais com o término da estação chuvosa e a época da estivação. Como em todo o litoral do Nordeste, predomina aí o regime de chuvas de outono. Entretanto, quando a estação sêca é razoàvelmente prolongada, vê-se que decai a população malacológica, independentemente do reinício das chuvas.

O exame detalhado do comportamento das colônias de moluscos em cada setor do rio Tapacurá permitiu, no entanto, distinguir três trechos principais, com notáveis diferenças (fig. 2):

pico anual pouco pronunciado, exceto em 1956.

2.º) No trecho médio, com 800 metros e em estreito contato com a zona urbanizada, tendo grande número de casas situadas à margem do rio, nota-se um ritmo acentuadamente marcado, com enorme e súbita elevação do número de moluscos capturados. O traçado da fig. 1 depende, aliás, predominantemente dos resultados dêste trecho. O pico de abundância no trecho médio não coincide com o do trecho superior, precedendo-o de 1 a 4 meses.

As águas desta porção do rio são fortemente poluídas com os esgotos da cidade que aí são lançadas sem qualquer tratamento.

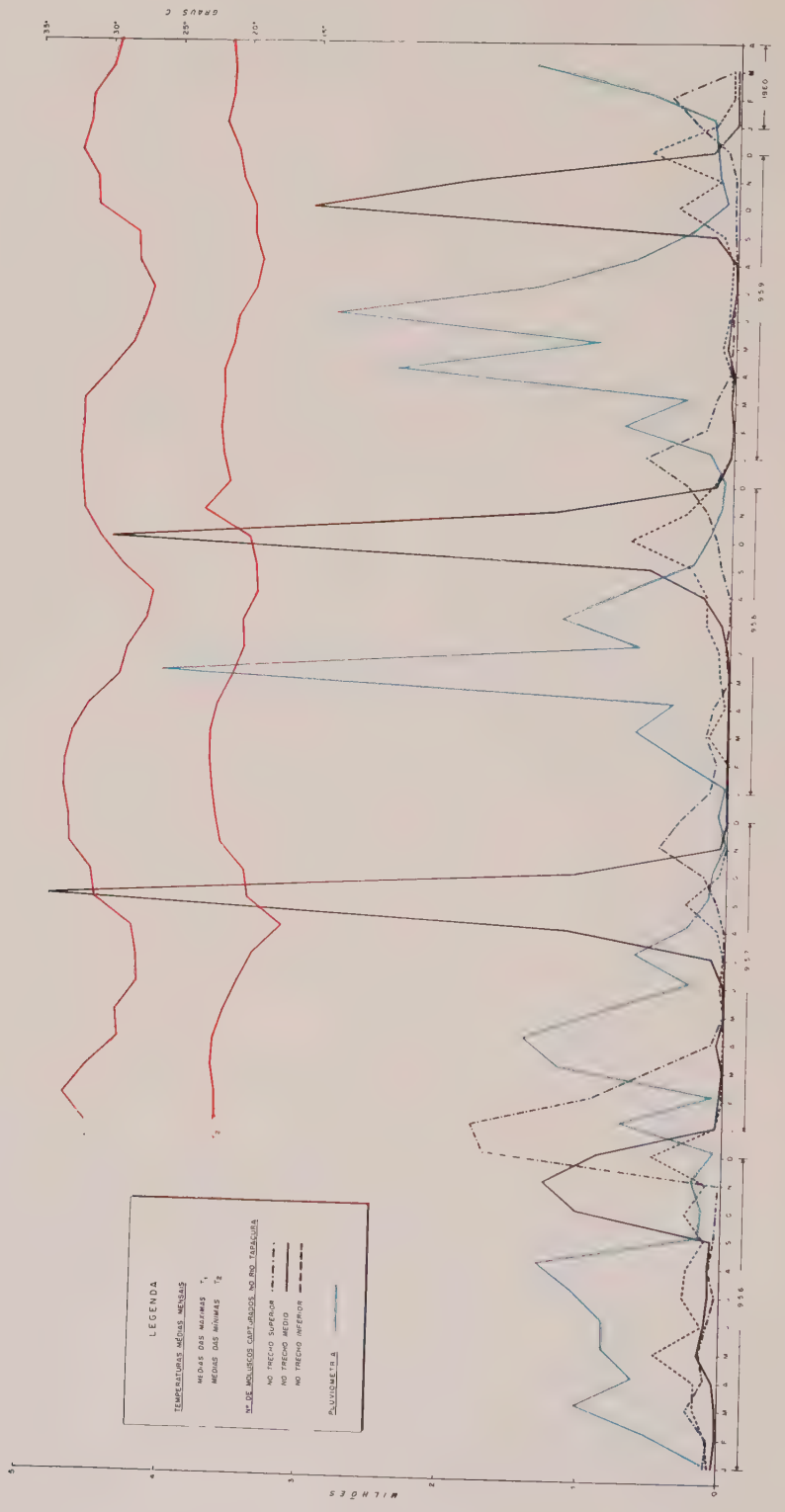

GRAUS C
35°
30°
25°
20°
15°
MILHÕES
0
1
2
3
4
5
1960
1959
1958
1957
1956
LEGENDA
TEMPERATURAS MÉDIAS MENSAIS
MÉDIAS DAS MÁXIMAS T1
MÉDIAS DAS MÍNIMAS T2
Nº DE MOLUSCOS CAPTURADOS NO RIO TAPACURÁ
NO TRECHO SUPERIOR
NO TRECHO MÉDIO
NO TRECHO INFERIOR
PLUVIOMETRIA

Fig. 2

3.º) No trecho inferior, de 2.400 metros, as alturas dos picos não excedem aquelas do trecho superior, porém sua coincidência no tempo se faz com os picos do trecho médio.

As observações feitas em Gravatá (Zona do Agreste) e em Escada (Zona da Mata), cidades situadas às margens do rio Ipojuca, mostram a existência de um pico elevado em novembro-dezembro de 1955 e concomitantemente em ambas as cidades.

Por outro lado, os traçados obtidos em Ribeirão e Moreno (Zona da Mata) lembram mais o comportamento dos trechos superior e inferior do rio Tapacurá, no Município de Vitória de Santo Antão. O período de observação (um ano e sete meses) é, no entanto, insuficiente para conclusões seguras.

DISCUSSÃO

O ritmo periódico de abundância de moluscos relaciona-se evidentemente com fenômenos climáticos e meteorológicos.

Entretanto, tal relação não pode ser estabelecida de modo direto com a distribuição das chuvas, devendo mediar, na seqüência causal, fatôres tais como o volume d'água nos criadouros, variação do teor de substâncias químicas orgânicas ou inorgânicas da água, riqueza nutritiva do meio, etc.

Convém assinalar que, nestas observações, ficou excluída a possibilidade de serem os dados coletados influenciados pela maior facilidade de capturar os moluscos, segundo o nível do rio. Uma simples análise dos gráficos, especialmente na fig. 2, mostra claramente isso.

A defasagem apresentada pelas colônias de moluscos em trechos contíguos de um mesmo rio chamam a atenção para a existência de outros fatôres de âmbito local ou inerentes às próprias colônias e que deverão ser futuramente investigados para um conhecimento mais aprofundado da biologia dos planorbídeos.

A importância de estudos dêste gênero, em diferentes lugares e por tempo prolongado, pode ser entrevista nos resultados aqui apresentados. Informações precisas sôbre épocas de grande aumento das populações malacológicas podem indicar a existência de maior transmissão da esquistossomose em certos meses do ano [6], bem como sugerir medidas de profilaxia em consonância com tal periodicidade. Entre estas medidas algumas poderão resultar do melhor conhecimento da biologia do vetor, das razões de sua proliferação, etc., outras decorrerão da possibilidade de ensaiar tratamentos moluscuicidas em momentos precisos e por curto prazo, tornando-os mais econômicos e incidindo de modo a truncar aquêles surtos de abundância dos planorbídeos em dado local.

Torna-se agora necessário continuar a detalhar estas pesquisas, colhendo informações sôbre a composição etária (tamanho) dos moluscos e o grau de infestação pelo *Schistosoma mansoni*, relacionando-os com a abundância de caramujos, o nível do rio e seu deflúvio, exame periódico da água, etc.

O ensaio com moluscuicidas poderá ser feito, em seguida, com bases mais objetivas e rigoroso contrôle dos resultados.

Os *Pelotões de Saúde*, compreendendo grande número de meninos adestrados e sob orientação cuidadosa, continuarão a desenvolver um trabalho notável e dificilmente realizável, em outras condições, com vistas para um efetivo combate à endemia esquistossomótica.

CONCLUSÕES

A abundância de planorbídeos, nos focos de esquistossomose investigados, mostra-se bastante diversa no decurso do ano, havendo um curto período (entre setembro e dezembro) de grande aumento populacional. A duração dêsse período estende-se de um a três meses.

Os picos da curva de abundância têm ritmo equivalente ao das estações chuvosas, incidindo ora no fim das chuvas ou bem mais tarde. Em diferentes trechos de um mesmo rio os picos podem estar defasados de alguns meses, demonstrando que a relação entre abundância de moluscos e precipitação não é direta.

Sendo de grande importância para a profilaxia da esquistossomose o conhecimento

das épocas mais favoráveis à transmissão da doença, sugerem os autores a extensão de investigações como esta a novas áreas, bem como um aprofundamento dos estudos com vistas a descobrir os fatôres que condicionam a proliferação dos planorbídeos em natureza.

SUMMARY

Epidemiology of schistosomiasis and periodic variation of malacologic populations in Pernambuco, Brazil.

Systematic and intensive collecting by groups of boys from the *Health Platoons* in Pernambuco (Brazil), made it possible to get important knowledge about the mollusc population variations (*Australorbis strami-neus*) in Vitória de Santo Antão and in other cities.

In Vitória a great abundance of snails was registered, occurring annually between September and December, with duration limited from one to three months. The abundance curve peaks are connected with the end of the wet seasons, occuring during the dry period. Nevertheless, different stretches of the same river present dephasing of their respective population curves which can reach up to from one to four months difference.

The water volume of the rearing places, their chemical characteristics, etc., as well as the particular behaviour of each mollusc colony, should be investigated in order to get a proper interpretation of the phenomenon.

Knowledge of epochs most favorable for transmission of schistosomiasis is of paramount importance as concerns prophylaxis of the disease; thus, the authors suggest extension of investigations like the present one to other areas, as well as more detailed studies aiming to discover factors conditioning proliferation of the planorbidae in nature.

REFERÊNCIAS

1. HOFFMAN, W. A. & FAUST, E. C. — La esquistosomiasis de Manson en Puerto Rico. Puerto Rico J. publ. Health & Trop. Med. **9**:281-291, 1934.

2. MARTINS, A. V. & VERSIANI, W. — Plano de combate à "Schistosomose mansoni" em Belo Horizonte. Hospital, Rio de Janeiro **15**: 563-570, 1939.

3. MOZLEY, A. — A background for the prevention of Bilharzia. London, Lewis, 1953.

4. PARAENSE, W. L. & SANTOS, J. M. — Um ano de observações sôbre esquistosomose em planorbídeos da Lagoa Santa. Rev. brasil. Malariol. **5**:253-269, 1953.

5. PELLON, A. B. & TEIXEIRA, I. — Distribuição da esquistossomose mansônica no Brasil. Rio de Janeiro, Divisão de Organização Sanitária, 1950.

6. REY, L. — Contribuição para o conhecimento da morfologia, biologia e ecologia dos planorbídeos brasileiros transmissores da esquistossomose; sua importância em epidemiologia. Tese Fac. Med. Univ. São Paulo. Rio de Janeiro, SNES, 1956.

7. REY, L. & PESSÔA, S. B. — Contribuição ao estudo dos focos de *Australorbis glabratus* (transmissor da esquistossomose mansônica) em Sergipe. Rev. clín. São Paulo **29**:85-108, 1953.

Recebido para publicação em 2 maio 1960.

Noticiário

PROF. ULHÔA CINTRA, NOVO REITOR DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Por indicação do Conselho Universitário e nomeação do Governador do Estado, assumiu a direção da Universidade de São Paulo o Prof. Antônio Barros de Ulhôa Cintra, Catedrático de Clínica Médica da Faculdade de Medicina e membro do Conselho de Redação desta Revista.

O novo Reitor, em entrevista que concedeu por ocasião de sua designação para o elevado pôsto, externou alguns de seus pontos de vista sôbre os problemas do ensino universitário.

Em primeiro lugar, destacou que "o papel básico da Universidade é o de formar cientistas" e, nessas condições, propõe-se a incentivar tudo que diga respeito à pesquisa nos Institutos de ensino superior de São Paulo.

"O momento brasileiro exige o desenvolvimento da ciência, pela via de todos os ramos da pesquisa, em muitos dos quais, aliás, a Universidade de São Paulo apresenta um desenvolvimento comparável ou superior mesmo, em determinados casos, ao de países que figuram entre os mais adiantados do mundo".

"Entre nós — observou o Prof. Ulhôa Cintra — a tecnologia prende-se por um lado ao artesanato e por outro à supervisão científica. O incentivo à supervisão científica, portanto, se impõe, em todos os ramos, como tarefa imediata".

Outro problema que considera importante, entre nós, reside na necessidade de se estabelecer maior e mais intensa integração entre os diversos setores afins dos diferentes Institutos da Universidade.

Questão das mais sérias, também, é a do elemento humano que se dedica às pesquisas, carente de estabilidade e segurança, mormente em face da inflação e elevação do custo de vida. Ainda que o problema assente suas raízes fora do âmbito estadual, promete o Prof. Ulhôa Cintra não descurar dêle, dentro das suas possibilidades na administração da Universidade.

Em relação à Cidade Universitária, em construção, propõe-se êle cumprir integralmente o que dispõe o Plano sôbre a transferência dos Institutos para lá, especialmente da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras.

FUNDO DE AMPARO À PESQUISA

O projeto de lei 1.953, que institui o Fundo de Amparo à Pesquisa, elaborado em obediência ao preceito constitucional que manda destinar 0,5% do orçamento estadual ao fomento da pesquisa científica, vem movimentando os meios científicos do Estado de São Paulo.

Aprovado já pelas Comissões da Assembléia Legislativa, o projeto deverá ir a plenário no mês de junho para votação. Por essa razão, os pesquisadores das diversas Faculdades e Institutos ligados à Universidade de São Paulo, decidiram manifestar seu interêsse pela rápida aprovação do projeto, entregando ao Presidente da Assembléia Legislativa um memorial com cêrca de mil assinaturas, entre as quais se encontra a do atual Reitor da Universidade, Prof. Ulhôa Cintra.

Com a aprovação dessa lei, estima-se que cêrca de 300 milhões de cruzeiros anuais virão em auxílio da investigação científica.

SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA

Realiza-se, de 3 a 10 de julho do corrente ano, na cidade de Piracicaba, São Paulo, e tendo por sede a Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiroz", a XII Reunião Anual da SBPC.

XI Jornada Brasileira de Puericultura e Pediatria

Organizada pela Sociedade Brasileira de Pediatria e sob os auspícios do Departamento Nacional da Criança, da Legião Brasileira de Assistência, do Departamento Municipal da Criança e do XI Distrito da Academia Americana de Pediatria, será realizada no Rio de Janeiro, entre 24 e 31 de julho do corrente ano, a XI Jornada Brasileira de Puericultura e Pediatria.

Para o tema oficial, Comissões Estaduais estão fazendo um levantamento da Assistência à Infância em todo o país, com uma análise crítica dos resultados apurados e apresentação de sugestões.

Do programa constam 4 simpósios sôbre: 1) *Diarréia do lactante* — coordenador: Prof. J. Martinho da Rocha; 2) *Meningites* — coordenador: Prof. F. Lombardi; 3) *Estreptococcias* — coordenador: Prof. Paulo de Góes; 4) *Poliomielite, problemas de recuperação* — coordenador: Prof. O. Pinheiro Campos.

XII Congresso Panamericano de Tuberculose

Realizar-se-á na Cidade do Salvador, Bahia, de 10 a 16 de julho próximo, o XII Congresso Panamericano de Tuberculose, sob os auspícios da União Latino-Americana das Sociedades de Tuberculose (ULAST).

Temas: 1) Revisão do valor dos índices epidemiológicos — relator: Prof. Fernando Gomes; 2) Futuro dos tuberculosos aparentemente curados — relator: Prof. Raul Vaccarezza.

Simpósios sôbre: 1) Quimioprofilaxia da tuberculose; 2) Ensino da tisiologia, propaganda e educação sanitária; 3) Micoses pulmonares; 4) BCG na América Latina; 5) Abreugrafia.

Além de conferências, está programado um curso sôbre cirurgia do tórax, aos cuidados do Prof. Fernando Paulino e sua equipe.

CURSO SÔBRE ALERGIA

Sob o patrocínio do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, da Sociedade de Investigações em Alergia e Imunologia e dos Serviços de Alergia da Faculdade de Medicina e do Hospital das Clínicas, foi organizado pelo Dr. Ernesto Mendes um curso de atualização sôbre "Temas de Alergia", a se efetuar de 18 a 23 de julho próximo, das 9 às 11 horas, no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina.

Os alunos inscritos poderão freqüentar a Seção de Alergia dêste Departamento e o Serviço de Alergia do Hospital das Clínicas.

PROFESSOR AGUIAR PUPO

Ao comemorar seu 70.º aniversário, o Prof. Aguiar Pupo deu na Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas a aula de despedida com que ora se retira do magistério superior. Colegas, discípulos e amigos prestaram-lhe, na ocasião, carinhosa homenagem.

Formado pela Faculdade de Medicina da Universidade do Brasil, em 1913, defendeu tese sôbre "Histopatologia da pele leprosa", publicando, desde então, diversos trabalhos relativos ao mal de Hansen.

Em 1927, foi chamado a chefiar a Inspetoria de Profilaxia da Lepra, cargo êsse em que concluiu as obras do Sanatório Santo Ângelo e iniciou a construção dos Sanatórios Pirapitingui, Cocais e Aimorés. Imprimindo caráter científico à campanha contra a lepra, contribuiu para projetar no cenário mundial a participação dos leprólogos paulistas. Empenhou-se também na luta contra as moléstias venéreas e no estudo da leishmaniose tegumentar.

Desde agôsto de 1929, passou a reger a Cátedra de Dermatologia e Sifiligrafia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de que agora se despede.

Por três vêzes foi chamado a dirigir os destinos desta Faculdade, introduzindo reformas e aperfeiçoando o currículo escolar, ao mesmo tempo em que empenhava em criar novos laboratórios e serviços especializados.

Às homenagens prestadas ao Prof. Aguiar Pupo, associa-se com muita satisfação a Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.